

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**La línea celular B4G12 como modelo
para el estudio de la función barrera del
endotelio corneal.**

**Implicación de RhoA y Rac1 en la
respuesta frente al estrés osmótico.**

DIANA SANTANDER GARCÍA

MADRID, 2016

MEMORIA PRESENTADA POR
DIANA SANTANDER GARCÍA
LICENCIADA EN MEDICINA Y CIRUGÍA
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTOR EN MEDICINA

DIRECTORES DE LA TESIS:

Dr. JAIME MILLÁN MARTÍNEZ

Dr. IGNACIO JIMÉNEZ-ALFARO MOROTE

Este trabajo ha sido realizado en el
Departamento de Biología Molecular
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
(CSIC-UAM)

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM) bajo la dirección del doctor Jaime Millán Martínez, Científico Titular del CSIC y del doctor Ignacio Jiménez-Alfaro Morote, profesor titular de Oftalmología, Departamento de Cirugía, UAM y Jefe de Servicio de Oftalmología de la Fundación Jiménez Díaz.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
RESUMEN	21
1. INTRODUCCION	25
1. La Córnea	25
I. Anatomía y fisiología	25
II. Histología	29
III. Respuesta corneal al daño	36
2. El endotelio corneal como epitelio transportador	38
3. Función de barrera y bomba endotelial	38
Integridad de la barrera y relación con la deturgescencia estromal	43
4. Plasticidad del citoesqueleto de actina y su influencia en la integridad de la barrera	47
I. El aparato contráctil, actomiosina, uniones adherentes y uniones estrechas	47
II. Las cadherinas y la biogénesis del citoesqueleto de actina	50
III. El PAMR regula la integridad endotelial en la córnea	51
IV. PAMR y la contracción de la actomiosina en el endotelio corneal	52
V. Formación y ruptura de las uniones estrechas en el endotelio	53
5. La familia de Rho GTPasas como reguladores centrales del citoesqueleto de actina	54
I. La formación de las uniones intercelulares está mediada por las Rho GTPasas	57
II. La desestructuración de las uniones intercelulares está mediada por las Rho GTPasas	59
6. Las proteínas Ezrina/radixina/moesina como interconectores entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina	59

7. Enfermedades endoteliales	61
I. Endoteliopatías primarias.....	61
II. Endoteliopatías secundarias.....	64
III. Tratamiento de las enfermedades endoteliales	67
IV. Tejido corneal donante y banco de ojos.....	68
 II. OBJETIVOS	73
1. Objetivo general.....	73
2. Objetivos específicos	73
 III. MATERIALES Y MÉTODOS	77
1. Materiales	77
1.1 Anticuerpos	77
1. 2 Reactivos	79
1.3 Oligonucleótidos para PCR cuantitativa	80
2. Métodos	81
2. 1. Líneas celulares, cultivos primarios y condiciones de cultivo	81
2.2 Tejidos.....	82
2.3. Obtención de extractos proteicos	83
2.4. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE), electrotransferencia e inmunodetección (Western-Blot)	83
2.5. Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	84
2.6. Ensayos de asociación de proteínas por pull-down con proteínas GST	86
2.7. Ensayos de resistencia eléctrica transmembrana ECIS	88
2.8. Extracción de RNA y expresión cuantitativa RT-qPCR	90
 IV. RESULTADOS	93
1. Caracterización de la línea celular B4G12 como modelo de estudio de la función barrera del endotelio de la córnea humana.....	93

La línea celular B4G12 adquiere su máxima confluencia cuando son cultivadas sobre placas de plástico recubiertas con colágeno.	93
2. Estudio de la respuesta de la línea celular B4G12 a un estrés disruptivo de la función barrera	98
I. La línea celular B4G12 altera su función de barrera en respuesta al estrés osmótico	98
II. El choque osmótico altera las uniones intercelulares e induce la polimerización de actina	100
III. El choque hiperosmótico aumenta la fosforilación de la cadena ligera de la miosina no muscular de tipo II	103
IV. El choque hiperosmótico activa ezrina, radixin y moesina, tres reguladores de la rigidez celular.....	104
V. Las células B4G12 expresan RhoA y Rac1, dos reguladores maestros de la actomiosina.....	105
VI. El choque hiperosmótico activa los reguladores maestros de actomiosina y proteínas ERMs: las Rho GTPasas RhoA y Rac1	108
VII. El choque hiperosmótico aumenta la fosforilación de MLC, a través de una ruta de señalización controlada por RhoA, pero no por Rac1	110
VIII. La inhibición de la miosina no muscular y de los microtúbulos disminuye la función barrera de forma constitutiva.....	113
IX. Expresión de proteínas ERM en la línea celular B4G12 y efecto del inhibidor de ezrina NSC 668394	115
X. El inhibidor de ezrina NSC668394 no tiene efecto sobre la pérdida de resistencia	117
XI. La inhibición de la ruta de señalización controlada por RhoA atenúa muy ligeramente la bajada de resistencia	118
XII. La vía de señalización Rho/ROCK está implicada en la homeostasis de la función barrera.....	123
3. Desarrollo del modelo animal Ex Vivo	126
V. DISCUSIÓN	131
1. La línea B4G12 como modelo celular para estudiar la función de barrera endotelial	131

2. El citoesqueleto de actomiosina desempeña una doble función en la regulación de la permeabilidad y mantiene la integridad de la barrera endotelial de la córnea	137
3. Las proteínas ERM y la contracción de las células B4G12.	139
4. El estrés osmótico activa el eje RhoA/ROCK como respuesta para preservar la función barrera endotelial	140
VI. Conclusiones.....	151
VII. BIBLIOGRAFÍA	155
VIII. ANEXO	185



ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

ADP: adenosín difosfato

AJ: del inglés *adherens junctions*

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

Arp2/3: del inglés *actin related protein 2/3 complex*

ATP: adenosín trifosfato

BSA: del inglés *bovine serum albumin*

Cdc42: del inglés *Cell division cycle 42*

D: dioptría

Dia1: Del inglés *Diaphanous homolog 1*

DMEM: del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: del inglés *deoxyribonucleic acid*

DSA EK: del inglés *Descemet Stripping with Automated Endothelial Keratoplasty*

DSEK: del inglés *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty*

DMEK: del inglés *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*

EBM-2: del inglés *Endothelial Basal Medium-2*

ECIS: del inglés *Electric Cell Substrate Impedance Sensing*

EDTA: del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EGM-2 : del inglés *Endothelial Cell Growth Medium-2*

ERK: del inglés *Extracellular-signal regulated kinases*

ERM: Del inglés *Ezrin, Radixin, Moesin*

F-actin: actina filamentosa

FITC: del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*

FLEK: del inglés *Femtosecond Laser assisted Endothelial Keratoplasty*

GAPs: del inglés *GTPase-Activating Proteins*

GDIs: del inglés *Guanosine nucleotide dissociation inhibitors*

GDP: guanosín difosfato

GEFs: del inglés *Guanine nucleotide exchange factors*

GST: del inglés *Glutathione S-Transferase*

GTP: guanosín trifosfato

GTPasa: guanosín trifosfatasa

HRP: del inglés *horseradish peroxidase*

HUVECs: del inglés *Human Umbilical Vein Endotelial Cells*

Hz: hercio

ICAM-1: del inglés *Intercellular adhesion molecule-1*

IF: Inmunofluorescencia

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

JAM: del inglés *Junctional adhesion molecule*

LIMKs: del inglés *LIM domain kinases*

MLC: del inglés *myosin light chain*

MLCK: del inglés *myosin light chain kinase*

MMP: metaloproteasas

Ohms: ohmios

PAK: del inglés *p21-activated kinase*

PBS: solución salina tamponada con fosfato

PIP: fosfatidíl inositol

PIP2: fosfatidíl inositol bifosfato

PIP3: fosfatidíl inositol trifosfato

PIP3K: del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*

PKC: del inglés *Protein kinase C*

RNA: del inglés *ribonucleic acid*

mRNA: del inglés *messenger ribonucleic acid*

ROCK: del inglés *Rho kinase*

Rtk: del inglés *rhotekin*

SDS: del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*

SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TBS: del inglés *Tris-buffered saline*

TJ: del inglés *tight junctions*

TEER: del inglés *transendothelial electric resistance*

TGF- β : del inglés *transforming growth factor*

TNF: del inglés *tumor necrosis factor*

TRITC: tetrametilrodamina

VEGF: del inglés *vascular epidermal growth factor*

WAVE: del inglés *WASP-family verprolin-homologous protein*

ZO: de zonula ocluddens



RESUMEN



RESUMEN

El endotelio corneal es responsable del mantenimiento de la transparencia corneal, requisito indispensable para una buena visión, al regular la hidratación de estroma de forma activa mediante bombas y transportadores. El endotelio corneal humano no tiene capacidad proliferativa *in vivo* y la densidad endotelial disminuye con la edad y con diversas enfermedades sistémicas u oftalmológicas, con la inflamación y con las cirugías intraoculares. Actualmente el tratamiento de las enfermedades endoteliales comprende un abanico desde el tratamiento tópico con colirios hipertónicos en los casos mas leves, hasta el trasplante corneal en los casos mas graves.

Debido a la falta de modelos experimentales para el estudio de la función barrera del endotelio corneal, en este trabajo hemos optimizado el cultivo de una linea celular establecida de endotelio corneal humano, la línea B4G12, como modelo para estudiar la función barrera.

La línea celular B4G12 crece con características mas similares al endotelio corneal *in vivo*, morfológicamente y funcionalmente, formando una monocapa confluyente, con uniones intercelulares maduras y estables, cuando se cultiva sobre cubres de plástico incubados con colágeno o fibronectina.

Para estudiar la función barrera, dada la sensibilidad de la línea celular al estrés osmótico hemos estudiado su respuesta. La exposición a estrés osmótico hipertónico en la línea B4G12 altera la función barrera de la monocapa endotelial al producir contracción de la actomiosina y desestructuración de las uniones intercelulares. Encontramos activación de las vías de dos de las Rho GTPasas más importantes en el control del citoesqueleto celular, RhoA y Rac1. Tras la exposición a estrés observamos un aumento de la fosforilación de MLC, necesaria para la contracción de la actomiosina, y de la fosforilación de las proteínas ERM, interconectores del citoesqueleto celular con la membrana plasmática. Ambos efectos forman parte de la vía de señalización de RhoA, y la inhibición farmacológica de ROCK, su mayor efector, con Y27632 reduce la fosforilación de MLC y de las proteínas ERM. Sin embargo, la inhibición de las vías de RhoA y Rac1 con inhibidores farmacológicos no sólo no disminuye la contracción, sino que

retarda la recuperación de la monocapa endotelial tras el cese del estrés osmótico. Estos resultados junto con el hecho de que el pretratamiento con activadores de RhoA y Rac antes de la exposición al estrés osmótico estimule la función barrera, indica que la activación de ambas vías podría formar parte de un mecanismo de respuesta para recuperar la homeostasis celular.

El desarrollo de un modelo experimental murino para la realización de experimentos *in vivo* y un mejor entendimiento de las vías implicadas en la señalización de la respuesta al estrés osmótico son pasos necesarios para el diseño de nuevos tratamientos para tratar la disfunción endotelial. Nuestros resultados muestran un posible papel de RhoA y Rac1 como posibles dianas terapéuticas para preservar la función endotelial.



INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCION

Más del 80% de la información que recibimos del mundo exterior, necesaria para relacionarnos con el entorno, se recibe por vía visual. Una buena visión depende de un buen estado de la córnea y del cristalino, que actúan como las lentes del ojo; de la retina, el tejido receptor que transforma un estímulo lumínico en un estímulo químico y eléctrico; del nervio óptico que transmite las señales al cerebro; y de este último, que integra y hace la síntesis final de los estímulos recibidos.

1. La Córnea

1. Anatomía y fisiología

La córnea es una estructura convexa que, junto con la esclera, compone la capa externa del globo ocular. Es el único componente transparente de la túnica externa del ojo, actúa como una ventana que permite la entrada de la luz al sistema óptico ocular (Figura 1). Es un tejido transparente y avascular que se localiza en la parte anterior del globo ocular, se continúa con la esclera opaca que está cubierta en su mitad anterior por la conjuntiva semitransparente. Está en contacto con la lágrima en su cara anterior y con el humor acuoso en la posterior. La córnea de un adulto mide 11-12 milímetros de diámetro horizontal y 9-11 milímetros de diámetro vertical. El grosor es de 550 micras en el centro y alcanza las 700 en la periferia, donde encontramos la zona de transición entre córnea y esclera, el limbo, que está muy vascularizado y contiene el reservorio de células madre pluripotenciales.

La córnea es una estructura esférica, lo que significa que su radio de curvatura va aplanándose según se aleja del centro de la córnea, donde alcanza 7,5-8,00 mm. Su poder de refracción es de 40-44 dioptrías, lo que supone más de las dos terceras partes de la capacidad refractiva ocular. El mantenimiento, tanto de su estructura interna como de su forma, es crítico para el correcto desempeño de sus funciones.

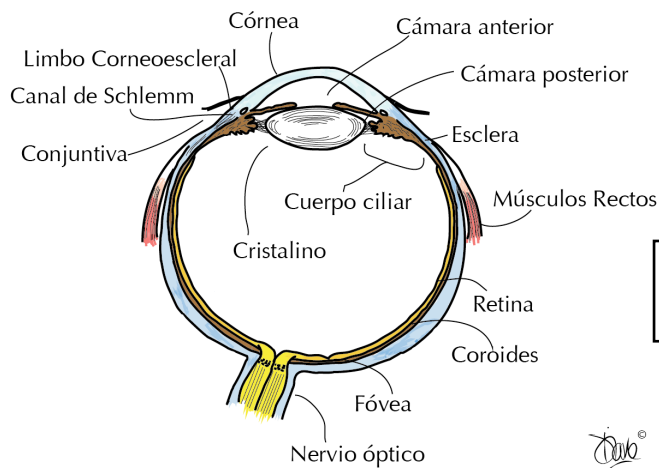


Figura 1: diagrama esquemático del ojo humano en una sección horizontal.

- **Propiedades ópticas de la córnea**

Las propiedades ópticas de la córnea están determinadas por su índice refractivo, su superficie, su transparencia y su contorno. Tanto la superficie anterior como la posterior contribuyen a su función óptica.

El índice refractivo se determina por la suma de la refracción de las caras anterior y posterior de la córnea, así como por las propiedades de transmisión del tejido. Los índices refractivos de aire, lágrima y humor acuoso son 1,00, 1,376 y 1,336 respectivamente. El poder dióptrico de una superficie curva se determina por el índice refractivo y el radio de curvatura. El poder dióptrico central es de aproximadamente +43 dioptrías, siendo este la suma del poder dióptrico de las interfaces aire-lágrima (+44D), lágrima-córnea (+5D) y córnea-humor acuoso (-6D). Se ha estipulado que el índice refractivo de la córnea es 1,3375.

La transparencia corneal depende de tres hechos:

1. El contenido hídrico de la córnea ha de mantenerse alrededor del 78%. La regulación del contenido hídrico depende tanto del epitelio como del endotelio corneales. El primero actúa como barrera física que impide el paso de agua de la lágrima al estroma, mientras que el endotelio, además de hacer de barrera posterior, impidiendo el paso de agua del humor acuoso al estroma, posee un sistema de bombas que crea un gradiente osmótico que favorece el paso de agua del estroma al acuoso (Edelhauser, 2006).

2. La disposición ordenada de las fibras de colágeno que forman el estroma corneal. Esta organización regular se cree que es la responsable de que la luz que se

dispersa por cada fibra de colágeno sea cancelada mediante interferencia destructiva por la luz dispersada por fibras vecinas (Maurice, 1984). Cuando se pierde esta distribución regular, lo que sucede en el edema corneal o en la fibrosis, se produce dispersión de la luz, lo que condiciona una pérdida de transparencia y por ende disminución de la visión.

3. La córnea es un tejido avascular, carece de vasos sanguíneos que pudieran impedir o modificar de algún modo la transmisión de la luz (Chang et al., 2001).

El epitelio corneal y la película lagrimal contribuyen al mantenimiento de una superficie lisa, sin irregularidades, necesaria para una buena visión (Courville et al., 2004).

La córnea es una estructura que actúa como una lente esféricilíndrica, con ejes mayor y menor. Al ser la lente más potente del sistema ocular, cualquier cambio en el contorno de la córnea, lo que sucede en condiciones patológicas como el queratocono o los leucomas corneales, causará un astigmatismo regular o irregular, modificando el punto en el que la luz se focaliza en la retina. El hecho de que alterando la curvatura de la córnea se modifique el poder refractivo del dioptrio ocular, ha favorecido el desarrollo de técnicas que corrigen defectos refractivos. Entre ellas, la más popular es la cirugía láser.

- **Inervación**

La córnea es uno de los tejidos del cuerpo con mayor inervación, posee una densidad de terminaciones nerviosas entre 300 y 400 veces mayor que la piel (Rozsa and Beuerman, 1982). La inervación corneal está compuesta por nervios sensitivos, que representan la mayor parte de la inervación corneal y dependen de la rama oftálmica del trigémino (Marfurt et al., 1989), y fibras del sistema nervioso autónomo (Müller, 2003). Las fibras sensitivas entran en el estroma superficial de manera radial, pierden la mielina y se unen formando una red que perfora la capa de Bowman y crea un plexo subbasal por debajo del epitelio (Müller et al., 1997). La pérdida del epitelio deja al descubierto las terminaciones nerviosas, lo que origina dolor severo.

Los nervios corneales tienen una variedad de funciones eferentes y sensitivas. La estimulación mecánica, térmica y química de los nervios corneales produce sensación de dolor.

Las fibras autonómicas son fibras simpáticas, procedentes del ganglio cervical superior (Morgan et al., 1987), y parasimpáticas, del ganglio ciliar (Marfurt et al., 1998).

La innervación es fundamental para la sensibilidad de la córnea y esencial para mantener la integridad y reparar el tejido.

- **Vascularización**

La córnea, junto con el cristalino y el vítreo es tejido avascular. Aunque en condiciones normales no posee vasos, necesita componentes de la sangre para mantener su función. Las arterias ciliares anteriores, ramas de la arteria oftálmica, forman una arcada vascular a nivel del limbo que se anastomosa con terminales de la arteria facial, procedente de la carótida externa. Los nutrientes los obtiene de los vasos limbares y de forma directa a través del humor acuoso y de la película lagrimal.

En determinadas condiciones patológicas, pueden aparecer vasos en el estroma de la córnea, lo que se traduce en una disrupción de la ultraestructura corneal con la consecuente pérdida de transparencia (Chang et al., 2001).

- **Aporte nutricional**

Tanto las células del epitelio corneal como las del endotelio corneal son metabólicamente activas. Como fuente de energía las células endoteliales obtienen adenosintrifosfato (ATP) vía glucólisis y ciclo de Krebs en condiciones aeróbicas. La córnea consigue la glucosa por difusión del humor acuoso y el oxígeno, por difusión de la película lagrimal (Gottsch et al., 1986; Weissman et al., 1981). Una disminución de la oxigenación corneal, como la que sucede en usuarios de lentes de contacto con baja permeabilidad al oxígeno, origina hipoxia corneal y edema (Holden et al., 1985). Durante la noche, al estar los párpados cerrados, la difusión de oxígeno disminuye, con lo que el metabolismo cambia a condiciones anaerobias y se produce una acumulación de ácido láctico.

La córnea está cubierta por la película lagrimal, que la protege de la deshidratación y mantiene su superficie sin irregularidades. Aunque más del 98% de la lágrima es agua, tiene muchos otros componentes, como electrolitos, glucosa,

inmunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, albúmina y oxígeno. Además, contiene muchas sustancias biológicamente activas como histamina, prostaglandinas, factores de crecimiento y citoquinas (Pflugfelder et al., 1999; Wilson et al., 1999). La película lagrimal, además de lubricar y ser fuente de nutrientes de la córnea, también tiene un papel importante en el mantenimiento y reparación epitelial.

II. Histología

La estructura de la córnea es relativamente simple comparada con otras partes del cuerpo. Las células epiteliales tienen origen en el ectodermo de superficie, mientras que los queratocitos y las células endoteliales derivan de células de la cresta neural del neuroectodermo. Sus características fundamentales, la transparencia y la resistencia, se deben a la distribución ordenada de sus componentes.

La estructura de la córnea consta de cinco capas (Figura 2):

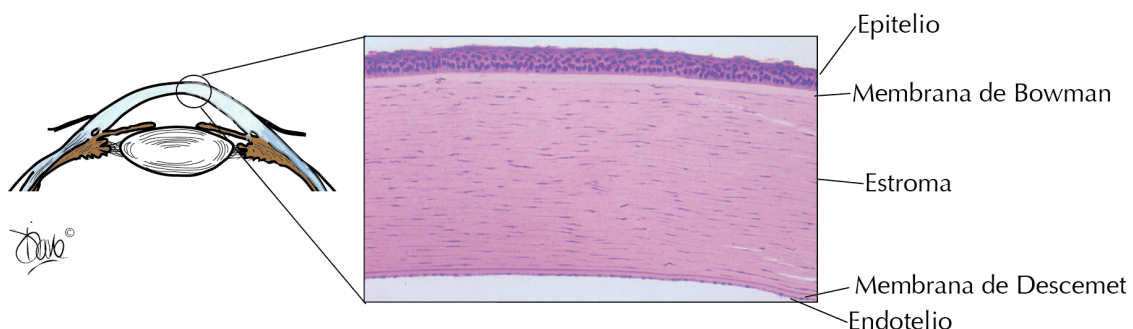


Figura 2: Imagen histológica de una córnea humana sana, tinción con hematoxilina-eosina (200x). Se aprecian las cinco capas, de superficial a profunda: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio.

i. Epitelio

El epitelio corneal y el epitelio conjuntival, con el que se continúa, forman la primera línea de defensa de la superficie anterior del ojo (Sack et al., 2001).

Es un epitelio escamoso, no queratinizado, estratificado, compuesto por 4-6 capas de células de estructura parecida a la epidermis. Tiene un grosor de 50 micras, lo que representa aproximadamente una décima parte del grosor corneal total. Sólo las células basales tienen capacidad proliferativa, y el recambio tarda entre 7 y 14 días (Wiley et al., 1991). Junto con la película lagrimal, forma la primera interfase

con poder refractivo del ojo, por lo que es vital mantener una superficie uniforme y regular para evitar la degradación de la imagen.

La película lagrimal representa una primera defensa frente a agresiones microbiológicas, tóxicas, químicas o mecánicas. También aporta factores inmunológicos y de crecimiento que son vitales para la proliferación y reparación del epitelio corneal.

Una de las funciones fundamentales del epitelio es la defensa, actuando como una primera barrera frente a insultos externos. La existencia de uniones intercelulares estrechas, así como la interdigitación de sus membranas celulares hace del epitelio una barrera muy poco permeable a sustancias químicas.

Los epitelios polarizados actúan como una barrera entre dos medios diferentes, permitiendo a su vez el transporte a través de las células. Esta regulación de la permeabilidad se debe a la existencia de complejos de unión, estructuras altamente especializadas que permiten la formación de una barrera impermeable.

El complejo de unión comprende cuatro tipos diferentes de uniones intercelulares, uniones tipo gap, uniones adherentes, uniones estrechas y desmosomas (Denker and Nigam, 1998). Las células se anclan a la matriz extracelular subyacente por integrinas que pueden unirse al citoesqueleto de actina o a filamentos intermedios. Las integrinas, además de actuar como componentes estructurales, actúan como señalizadores intracelulares que afectan a la proliferación, migración y supervivencia celular (Stepp, 2006). Para el mantenimiento de la estructura normal estratificada y de las funciones fisiológicas de la córnea (y de cualquier otro tejido), son necesarias interacciones tanto célula-célula como célula-matriz. Estas uniones, junto con factores secretados, son responsables de la señalización que puede modificar la expresión génica y afectar al fenotipo celular, función y supervivencia.

La existencia de fuertes adhesiones intercelulares, así como la rápida regeneración epitelial, supone un mecanismo eficaz de defensa frente a las continuas agresiones externas.

Además, el epitelio corneal tiene en la periferia células presentadoras de antígeno, macrófagos especializados procedentes de la médula ósea llamadas células de Langerhans. Estas células expresan moléculas del antígeno de histocompatibilidad tipo II, y se cree que forman parte del brazo aferente de la

respuesta inmune al presentar antígenos a los linfocitos T. En condiciones normales, se encuentran en la periferia, pero ante un daño corneal migran a la zona dañada (Gillette et al., 1982).

ii. Capa de Bowman

En realidad, se trata de una condensación de fibras de colágeno y proteoglicanos de la parte más anterior del estroma, sobre la que se encuentra la membrana basal del epitelio corneal. Está presente en humanos y otros mamíferos, pero no en roedores. Las fibras de colágeno son sintetizadas por los queratocitos estromales, por lo que existe continuidad entre estas fibras de colágeno y las del estroma. No se regenera tras el daño.

Su función es desconocida, aunque se cree que tiene que ver con el mantenimiento de la estructura epitelial (Wilson and Hong, 2000). Sin embargo, dado el hecho de que tras la ablación con láser Excimer se forme y mantenga un epitelio de características normales, aun a pesar de la ausencia de la capa de Bowman, o de que animales que carecen de esta capa, como los roedores, sean capaces de formar y mantener una estructura epitelial organizada, pone en duda la función hasta ahora asumida. Probablemente, la capa de Bowman actúe como una barrera biológica y física y pueda tener que ver con el desarrollo de fibrosis subepitelial (Obata and Tsuru, 2007).

iii. Estroma

Representa aproximadamente el 90% del grosor total. Embriológicamente, procede de una segunda oleada de células de la cresta neural, tras el establecimiento del epitelio primitivo, en la séptima semana de gestación. Muchas de las características de la córnea, incluyendo su resistencia, la estabilidad de su forma y la transparencia, son atribuibles a las propiedades anatómicas y bioquímicas del estroma.

El estroma se compone de matriz extracelular, queratocitos (que sólo representan un 2-3% del total) y fibras nerviosas. La matriz extracelular está compuesta fundamentalmente por fibras de colágeno y glucosaminoglicanos. La disposición ordenada, así como el lento recambio de las fibras de colágeno, son

esenciales para el mantenimiento de la transparencia corneal. Tanto el epitelio como el endotelio regulan la hidratación del estroma. Ambos juegan un papel importante en el mantenimiento de las actividades biológicas de los queratocitos y en la disposición ordenada y regular de las fibras de colágeno. Las fibras de colágeno, de 25-30 micras de diámetro, se organizan de manera ordenada en lamelas que se distribuyen de limbo a limbo de forma paralela a la superficie ocular. Tanto el diámetro de las fibras como la separación entre ellas es uniforme, y cualquier alteración en la distribución regular, como lo que ocurre en el edema corneal o en la cicatrización estromal, puede conducir a la pérdida de transparencia corneal. El principal tipo de colágeno en el estroma corneal es el de tipo I, pero el colágeno tipo V es necesario para iniciar el ensamblaje del colágeno en fibrillas. El crecimiento del diámetro inicial de la fibrilla está regulado por interacciones entre los colágenos V y I y está modulado y mantenido por las proteínas de los proteoglicanos, decorin, lumican, keratocan y biglican que interfieren y limitan la asociación lateral de moléculas de colágeno durante el crecimiento en grosor de la fibrilla. El espacio entre fibrillas está determinado por el tamaño uniforme de los proteoglicanos y por las propiedades hidrofílicas de las cadenas laterales del keratán sulfato, que es el proteoglicano más abundante de la córnea y representa aproximadamente el 65%. Todos estos productos, así como los genes que regulan las modificaciones postraduccion, se expresan en otras matrices extracelulares pero en distinta proporción. Esto sugiere que los queratocitos podrían regular la expresión de otros genes para producir una matriz extracelular transparente (Hassell and Birk, 2010).

Entre las fibras de colágeno hay glicosaminoglicanos que tienen la habilidad de absorber y retener grandes cantidades de agua. Aunque la regulación del contenido hídrico del estroma corneal se debe fundamentalmente a la existencia de una bomba endotelial, también se ve influenciado por la barrera epitelial, la evaporación superficial, la presión intraocular y la presión de hinchado corneal. Por lo tanto, la matriz extracelular tiene un papel importante en el mantenimiento de la hidratación (y por ende de la transparencia) corneal.

Cuando la córnea aumenta su contenido hídrico, por daño en el endotelio corneal o disfunción en la bomba endotelial, se produce una alteración en la

distancia interfibrilar del colágeno estromal que dispersa la luz incidente, con la consecuente pérdida de transparencia.

Los queratocitos, principal componente celular del estroma, se encuentran formando una malla entre las lamelas de colágeno. A través de uniones intercelulares en sus procesos, los queratocitos están en comunicación unos con otros, por lo que se comportan como un sistema único. Son responsables del mantenimiento de los componentes estromales, la homeostasis bioquímica y estructural del estroma corneal se mantiene a través de la regulación de la síntesis y degradación de la matriz extracelular.

iv. Membrana de Descemet

Es la capa que actúa como membrana basal del endotelio corneal. Su grosor en el nacimiento es de 3 μm y se va engrosando hasta 8-10 μm en la edad adulta. Se adhiere fuertemente a la cara posterior del estroma y refleja cualquier cambio en el mismo. Está compuesta por diferentes tipos de colágeno, fundamentalmente colágeno tipo VIII y tipo IV, y laminina aunque también posee fibronectina entre otros componentes (Kabosova et al., 2007). Los roles generalmente propuestos para las membranas basales tienen que ver con adhesión celular, migración, diferenciación y transducción de señales. Sin embargo, la función de la membrana de Descemet sigue siendo desconocida.

En 2013 Dua publicó el hallazgo microscópico en córneas donantes de una capa de colágeno, entre el estroma y la membrana de Descemet, de 15 micras de espesor, resistente e impermeable al aire. De confirmarse este hallazgo por otros grupos, esta capa podría tener implicaciones médicas importantes, pues podría ayudar a obtener mejores resultados en la queratoplastias y modificar el entendimiento que tenemos de procesos patológicos como el hidrops agudo, las distrofias predesceméticas o el descematocele (Dua et al., 2013).

v. Endotelio

La cara interna de la membrana de Descemet está cubierta por una monocapa de células con una distribución uniforme en mosaico (Figura 3). Estas células miden 5 μm de grosor, 20 μm de anchura y son poligonales, generalmente

hexagonales. Embriológicamente, provienen de la cresta neural. Se extienden por toda la superficie posterior de la córnea y llegan hasta la malla trabecular. La membrana de Descemet a su vez también se fusiona con los haces trabeculares y esta unión es visible en la exploración y se conoce como línea de Schwalbe.

Esta monocapa de células poligonales es la principal responsable de mantener la deturgescencia estromal.

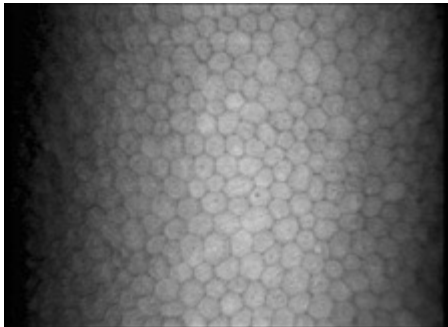


Figura 3: Biomicroscopía especular *in vivo* de un endotelio humano normal. Obsérvese la apariencia regular y poligonal, al ser la mayor parte células hexagonales.

Las células endoteliales corneales son metabólicamente activas, con requerimientos energéticos sólo superados por la retina dentro del globo ocular. Poseen un núcleo bien definido, abundantes mitocondrias y un aparato de Golgi muy desarrollado para generar las proteínas necesarias para la formación de la membrana de Descemet.

La cara apical posee microvillis, que están en contacto con el humor acuoso y cuya función está aún por describir.

El endotelio corneal actúa como una barrera permeable. Las membranas de las células se interdigitan y forman uniones estrechas llamadas clásicamente zónula occludens. La distribución de las mismas es discontinua, a diferencia de las zónulas occludens de otros epitelios transportadores. También se han descrito uniones adherentes y tipo gap.

Las células endoteliales corneales no se dividen en humanos, primates y gatos, pero sí en ratones y conejos. En el momento del nacimiento la densidad celular endotelial es de 6000 células/mm² y se reduce hasta alrededor de 3500 células /mm² a los cinco años. La celularidad en el endotelio corneal humano disminuye a una tasa de pérdida normal de 0,6% por año (Bourne et al., 1997). Además, esta pérdida puede aumentar en determinadas condiciones patológicas, como los traumatismos, la cirugía intraocular, la inflamación, la diabetes, el

glaucoma o las distrofias endoteliales. Cuando se produce pérdida celular, las células adyacentes migran y se expanden para cubrir la zona desnuda, por ello las células aumentan de tamaño y pierden su forma hexagonal.

La morfología celular endotelial (tamaño y forma) se correlaciona con la función de bomba. Un aumento en el tamaño celular (polimegatismo) y un aumento en la variación de la forma (pleomorfismo) se correlacionan con una capacidad reducida de mantener la deshidratación estromal (Edelhauser, 2000).

Si la densidad endotelial cae por debajo de un nivel, generalmente considerado de 500 células/mm², se pierde la función barrera y la córnea se edematiza más de lo que la actividad de las bombas restantes puede contrarrestar, lo que produce queratopatía bullosa y pérdida de visión.

La falta de proliferación *in vivo* de las células endoteliales es debida a que las células se quedan secuestradas en la fase G₁ del ciclo celular o que incluso entran en fase G₀. Aunque no se dividen *in vivo*, las células endoteliales tienen capacidad proliferativa *in vitro*, lo que hace pensar que existe algún mecanismo de inhibición local. Para explicar este hecho se han propuesto varios mecanismos:

1. Inhibición por contacto, observándose una correlación entre el momento de cese de la división en el ciclo celular con el momento de maduración de las uniones intercelulares (Joyce et al., 1998).

2. Falta de secreción autocrina o paracrina de factores de crecimiento sintetizados por el endotelio o falta de respuesta a factores sintetizados por el propio endotelio o expresados en la Descemet. Puede ser que no estén presentes en las concentraciones adecuadas, que haya una dificultad de unión con los receptores o que estén presentes en formas inactivas, lo que produciría una señal mitogénica insuficiente.

3. Supresión de la entrada en la fase S del ciclo celular por la presencia de TGFβ-2 en el humor acuoso (Joyce, 2012).

La capacidad proliferativa de las células endoteliales sigue una distribución topográfica característica, es prácticamente nula en las células endoteliales que ocupan los seis milímetros centrales y aumenta hacia la periferia (Yamagami et al., 2007).

III. Respuesta corneal al daño

í. Epitelio

El daño más común en el epitelio corneal es el mecánico, aunque también puede producirse daño térmico o químico. Cuando se crea una disrupción en la barrera epitelial, las células adyacentes cubren el defecto por una combinación de migración y expansión celular. Para que esto sea posible, son necesarios cambios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos, como la creación de extensiones de membrana, desaparición de hemidesmosomas y aumento en la producción de energía.

Esta es la primera parte de la respuesta reparadora, una parte no mitótica temprana, en la que la fibronectina parece jugar un papel clave en la mediación de la migración celular y la adhesión célula-célula. Tras 24-48 horas la población de células epiteliales comienza a crecer. Sólo las células basales y las células madre limbares participan en este proceso de mitosis (Wiley et al., 1991).

íí. Estroma

El proceso de reparación del estroma consta de tres partes: reparación, regeneración y remodelación (Fini and Stramer, 2005). De manera similar al proceso de reparación de heridas que se produce en la piel, la reparación de heridas en el estroma corneal implica una compleja interacción de citoquinas, factores de crecimiento y quimiocinas, aunque carece de componente vascular, que sí está presente en la reparación de la piel (Netto et al., 2005).

La primera respuesta es la activación y migración de los queratocitos estromales, lo que ocurre en un plazo de horas desde el daño. Estas células cuando se activan se parecen y comportan como fibroblastos. Los queratocitos en el área dañada entran en apoptosis y esto produce la activación de los queratocitos vecinos, lo que parece que modula la respuesta de reparación estromal (Wilson et al., 1996). Pasadas 1-2 semanas, aparecen en el área dañada miofibroblastos con capacidad contráctil. Estas células aumentan la producción de metaloproteasas (MMP), una familia de enzimas proteolíticas responsables de la remodelación de la matriz extracelular, interacción célula-matriz, reclutamiento inflamatorio y activación de

citoquinas. Parece que la sobreexpresión de estas MMP junto con las citoquinas proinflamatorias pueden ser las responsables de la pérdida de isoformas específicas de colágeno tipo IV en la membrana basal epitelial, lo que origina cicatrices y opacidad estromal o haze. Más que la ausencia o la presencia de estas citoquinas, lo que parece modular la reparación del estroma corneal es la interacción entre estas citoquinas, metaloproteinasas y otros mediadores (Gabison et al., 2009).

iii. Endotelio

La pérdida o daño de células endoteliales corneales produce una alteración en los mecanismos de deturgescencia y conduce a un aumento del contenido hídrico del estroma.

El daño a la monocapa endotelial produce una rápida distorsión de la misma. Como se ha mencionado anteriormente, las células endoteliales *in vivo* no entran en mitosis, por lo que las células dañadas se reemplazan por el agrandamiento de las células vecinas y la migración centripeta hacia la zona dañada. Este proceso se produce en tres etapas: la primera se caracteriza por la migración de células adyacentes que se unen formando una barrera temporal, con un menor número de bombas y uniones intercelulares incompletas. En una segunda fase las uniones intercelulares maduran y el número y la función de bombas vuelven a valores normales. Las células endoteliales forman polígonos irregulares, el grosor corneal vuelve a valores normales y la transparencia se recupera. La tercera etapa es la remodelación de las células endoteliales para conseguir hexágonos regulares, proceso que puede prolongarse meses (Watsky et al., 1989).

El endotelio tiene una respuesta limitada al estrés. Un estrés moderado puede alterar la forma y tamaño de las células, mientras que un estrés de mayor cuantía puede originar la pérdida, así como alteraciones irreversibles en el citoesqueleto celular (Kim et al., 1992). Las fuentes de estrés pueden ser metabólicas (hipoxia o hiperglucemia) (Shenoy et al., 2009), tóxicas (de fármacos o sus conservantes) (Naor et al., 2001; Eleftheriadis et al., 2002; Buzard et al., 2010) o causadas por alteración en el pH o en la osmolaridad (Edelhauser et al., 1981; Armitage et al., 1988). Por ejemplo el uso de lentes de contacto origina hipoxia en varios grados, a la larga esto

origina cambios en la morfología, microanatomía y probablemente en la función del endotelio (Polse et al., 1990; Bonanno, 2001).

Según diversos estudios, el endotelio corneal tiene una tolerancia al pH comprendida entre 6,8 y 8,2 (Ehlers, 1966) y tolera un rango de osmolaridad de 250 a 350 mOsm (Edelhauser et al., 1981)

2. El endotelio corneal como epitelio transportador

El endotelio corneal actúa como un epitelio transportador. Estos epitelios presentan dos vías de transporte para solutos y agua, la vía transcelular, a través de la célula y la vía paracelular, constituida por el espacio lateral intercelular y las uniones estrechas. La contribución relativa de ambas vías en el endotelio corneal no está claramente definida. Generalmente, se asume que los solutos hidrofóbicos y aquellos para los que existen transportadores específicos atraviesan el endotelio por la vía transcelular. Asimismo los solutos hidrofílicos lo hacen a través de la vía paracelular, con la tasa de permeabilidad dependiendo de las uniones estrechas. La vía de movimiento del agua sigue siendo un tema controvertido. Generalmente, se ha aceptado que el transporte transcelular de solutos genera gradientes osmóticos que a su vez provocan movimiento de agua, incluso en epitelios con uniones estrechas permeables (Mergler and Pleyer, 2007). En los últimos años ha surgido la teoría de la vía paracelular por la que la diferencia de potencial creada a través del endotelio generaría una corriente eléctrica que arrastra fluido por acoplamiento electrosomótico en las uniones estrechas (Fischbarg, 2010; Diecke et al., 2011).

3. Función de barrera y bomba endotelial

La córnea es el componente con mayor poder refractivo del sistema óptico ocular. El epitelio corneal actúa de barrera, el estroma corneal le proporciona la forma adecuada y el endotelio corneal se encarga del mantenimiento del contenido hídrico del estroma.

En el estroma corneal, entre las fibras de colágeno encontramos a los glicosaminoglicanos, moléculas hidrofílicas con gran capacidad de atraer agua hacia el interior del estroma. Esta capacidad hidrofílica se denomina presión de hinchado corneal. Esta presión negativa, de 55mmHg induce paso de fluido del acuoso al interior de la cornea y está inversamente relacionada con el grosor corneal. En la córnea sana la presión de hinchado corneal se ve contrarrestada por los mecanismos de transporte activo del endotelio corneal que mantiene el estroma relativamente deshidratado (78% contenido hídrico).

En los años 50, para explicar el mecanismo de mantenimiento de la transparencia corneal Maurice desarrolló la hipótesis pump-leak en su trabajo con endotelio de conejo (Maurice, 1951) aceptada como el modelo básico de control de la hidratación corneal. En su formulación original, Maurice postulaba que existía un equilibrio entre la deshidratación del estroma corneal y la presión de hinchado corneal, generada por los glicosaminoglicanos estromales que atraen agua al interior del estroma. La existencia de una bomba en el endotelio genera activamente un gradiente osmótico que contrarresta la presión de hinchado corneal.

Esta deshidratación está mediada por un gradiente osmótico en el que el agua pasa de un estroma hipo osmótico a un humor acuoso relativamente hipertónico. Este movimiento pasivo está mantenido por la creación de un gradiente osmótico que sí requiere energía. Los dos sistemas más importantes de transporte son la bomba ATPasa Na-K⁺ y la vía intracelular de la anhidrasa carbónica. La actividad de ambas vías produce el flujo neto de iones desde el estroma al humor acuoso, generándose así el gradiente.

La función de la bomba endotelial, similar a la de otros epitelios transportadores depende de mecanismos de transporte iónicos localizados en la membrana basolateral y apical de la célula. Estos mecanismos de transporte originan un movimiento neto de Na⁺ y de HCO₃⁻ y Cl⁻ desde el estroma al humor acuoso. Basándonos en la teoría del “gradiente sostenido” (Diamond and Bossert, 1967), podemos afirmar que el flujo iónico origina un gradiente osmótico a través de la membrana apical causando un movimiento vectorial de fluido hacia la cámara anterior. En los años 70 diversos estudios mostraron que el transporte de fluidos endotelial y el potencial eléctrico transmembrana quedaban abolidos al inhibir la bomba Na⁺/K⁺ con el glucósido cardíaco ouabaína o al retirar del medio Na⁺ o K⁺,

hallazgo típico de los epitelios transportadores (Hodson, 1974; Jumbblatt, 1981). Además, el potencial eléctrico transmembrana y el transporte de fluidos en el endotelio corneal también quedan abolidos con la ausencia de HCO_3^- y disminuye significativamente con la presencia de inhibidores de anhidrasa carbónica (Fischbarg and Lim, 1974). Estos datos, junto al hecho de que se haya demostrado un flujo neto del dominio basolateral al apical de HCO_3^- , sugieren que el bicarbonato es el principal anión.

El endotelio posee sistemas de transporte que contrarrestan la imbibición de agua del estroma. El gradiente existente en la concentración de Na^+ entre el humor acuoso (143 mEq/L) y el estroma corneal (134 mEq/L), origina un flujo de iones de Na^+ del acuoso al interior de las células y un flujo en dirección opuesta de K^+ . La bomba ATPasa de Na^+/K^+ se encuentra en las membranas basolaterales de las células endoteliales de la córnea y usa energía en forma de ATP para mantener el gradiente osmótico, expulsando Na^+ fuera de la célula acoplado con K^+ , que viaja en dirección opuesta (Figura 4).

La naturaleza transportadora del epitelio, junto a la existencia de un potencial eléctrico transmembrana negativo en el lado apical, sugieren un flujo neto de aniones del estroma a la cámara anterior, actuando el Na^+ como contraión. La sensibilidad del transporte endotelial al HCO_3^- y a inhibidores de anhidrasa carbónica sugiere que los transportadores de HCO_3^- y/o los transportadores implicados en la regulación del pH intracelular, junto con la anhidrasa carbónica, podrían jugar un papel en el transporte iónico. Los diferentes canales que podrían participar en el movimiento vectorial de fluido se han estudiado y revisado ampliamente (Bonanno, 2003).

Además, en la membrana celular existen unas proteínas integrales llamadas aquoporinas que se comportan como canales de agua selectivos. En el endotelio corneal encontramos las isoformas AQP1 y AQP4 (Kevin L Schey, 2014).

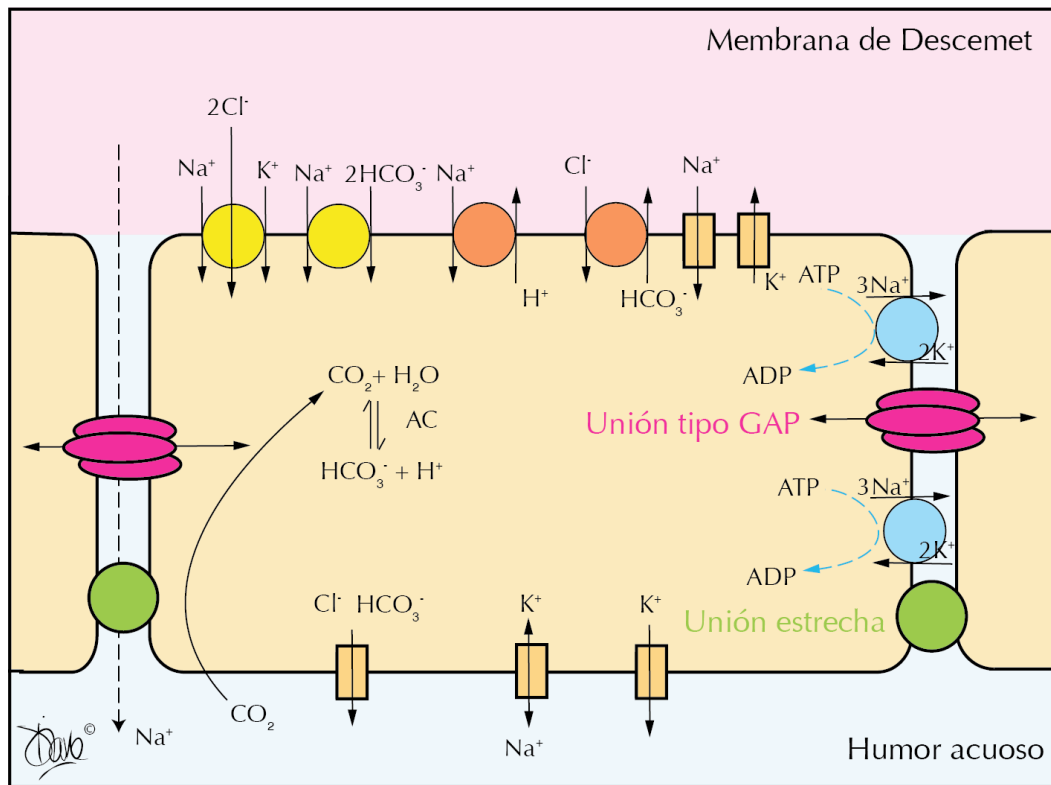


Figura 4: Modelo de transporte HCO_3^- en el endotelio corneal. La ATPasa Na^+/K^+ genera una concentración intracelular baja de $[\text{Na}^+]$ y alta de $[\text{K}^+]$ y, en conjunto con canales de K^+ , generan un potencial de membrana de -55mV . En la membrana basolateral hay dos transportadores de HCO_3^- : un cotransportador 2HCO_3^- (SCL4A4, NBCe1) y un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (SCL4A2, AE2), así como un intercambiador Na^+/H^+ (SCL9A6, NHE1). NBCe1 favorece la entrada al espacio intracelular de HCO_3^- y NHE1 de forma indirecta, al disminuir la concentración de H^+ intracelular, desplaza la reacción catalizada por la anhidrasa carbónica hacia la formación de bicarbonato a partir del CO_2 . En la membrana basolateral, encontramos un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, que reduce la $[\text{HCO}_3^-]$ intracelular y aumenta la de $[\text{Cl}^-]$, y un cotransportador $\text{Cl}^-/\text{Na}^+/\text{K}^+$ que aumenta la $[\text{Cl}^-]$ por encima del equilibrio electroquímico. En el lado apical, se han identificado al menos dos canales aniónicos CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) y CaCC (Calcium activated Chloride Channel), que favorecen la permeabilidad de Cl^- frente a HCO_3^- en una ratio de 4:1. No hay evidencia de intercambiador en la membrana apical de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. El exceso de HCO_3^- intracelular se transforma en una reacción catalizada por la anhidrasa carbónica en CO_2 que difunde libremente por las membranas celulares. En la membrana apical se encuentra la anhidrasa carbónica IV que cataliza la formación de nuevo de HCO_3^- para mantener los gradientes osmóticos funcionando. El dióxido de carbono difunde libremente hacia el citoplasma donde, mediado por la anhidrasa carbónica, reacciona con agua produciendo HCO_3^- que puede difundir libremente o ser transportado de nuevo, acoplado a un flujo de agua hacia el humor acuoso.

La visión clásica de la secreción y absorción de las células epiteliales es que estas generan un gradiente osmótico en los espacios laterales y/o apicales de las células. Los gradientes osmóticos generados sirven de fuerza motora para el movimiento de agua a través de endotelio, sin embargo, en la mayoría de los

epitelios transportadores, incluido el epitelio corneal, no hay evidencia de que este gradiente osmótico exista. Esto ha llevado a la consideración de otras hipótesis y modelos, como el mecanismo electro osmótico o transporte paracelular. Según este modelo, las células crean un potencial transepitelial (0,5mV negativo en apical) gracias a la acción de los canales aniónicos de Cl^- y HCO_3^- . Estos canales crean un flujo que arrastra contraiones, como el Na^+ a través del espacio paracelular que está recubierto de cargas negativas fijas, lo que favorece que la vía paracelular sea Na^+ específica. Esto produce un acoplamiento electro osmótico a través de las uniones estrechas. Fischbarg revisó en el año 2010 las evidencias a favor y en contra del modelo electro osmótico y otros modelos de transporte de fluidos (Fischbarg, 2010).

Para que este movimiento de fluido transcelular sea eficaz es imprescindible que las uniones estrechas estén íntegras. Primero, porque las uniones estrechas impiden que los gradientes iónicos se disipen al limitar el flujo de fluidos a través del espacio paracelular, y en segundo lugar, porque actúan como valla de separación, impidiendo la difusión lateral de las proteínas de membrana que componen los mecanismos de transporte iónico. Esta función de separación, es un proceso lento, crítico para mantener la polaridad endotelial. En ausencia de esta distribución polarizada, el movimiento vectorial de fluidos a través del endotelio no sería posible. Por lo tanto, para mantener la deturgescencia estromal son necesarias la actividad secretora por la bomba y la integridad de la función barrera (Figura 5, adaptada de (Srinivas, 2012), microscopía óptica del acervo fotográfico de la asociación para evitar la ceguera en México, APEC).

Los mecanismos de mantenimiento de este equilibrio entre entrada y salida de fluidos son relativamente desconocidos, y multitud de estudios en endotelio vascular y otros epitelios transportadores indica un papel importante de la remodelación del anillo de actomiosina del complejo apical en la integridad de la barrera endotelial (Garcia et al., 1995; Turner et al., 1997; Stevens et al., 2000; Patterson et al., 2000; Turner, 2000).

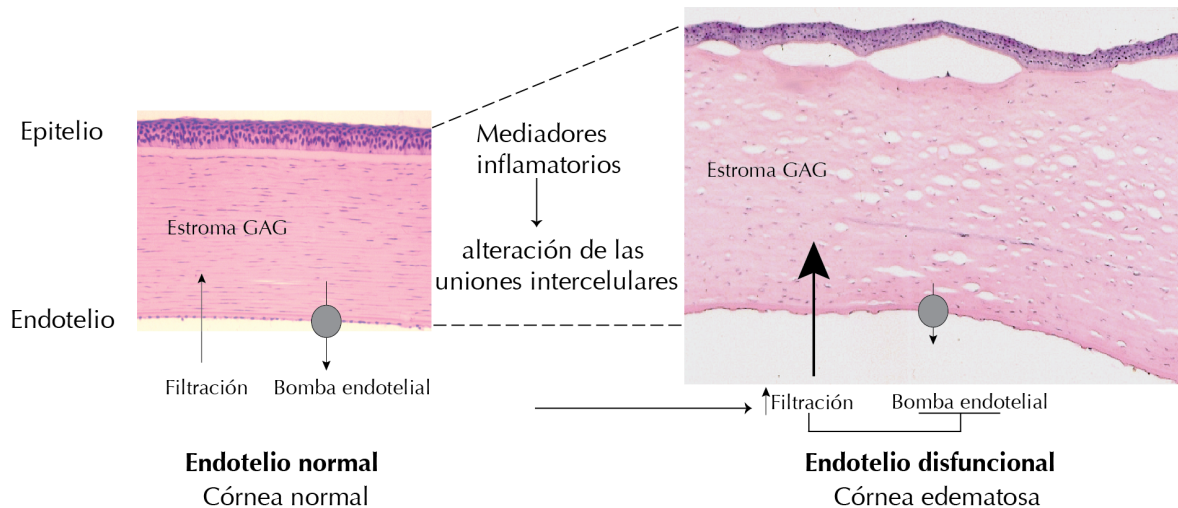


Figura 5: En condiciones normales, existe un equilibrio entre el movimiento de fluido hacia el estroma o filtración, impulsado por la presión de hinchado corneal, y la capacidad deshidratadora del endotelio corneal con su bombeo activo. Cuando se altera la integridad de la barrera la capacidad de extraer agua del estroma de la bomba endotelial, se sobrepasa y aparece edema corneal. Además, al alterarse las uniones intercelulares se disipan los gradientes generados por el transporte iónico que son necesarios para el funcionamiento de la bomba endotelial.

Integridad de la barrera y relación con la deturgescencia estromal

Los cuatro tipos de uniones intercelulares de los epitelios transportadores se describen a continuación y se esquematizan en la Figura 6. En endotelio corneal no se han descrito desmosomas ni hemidesmosomas.

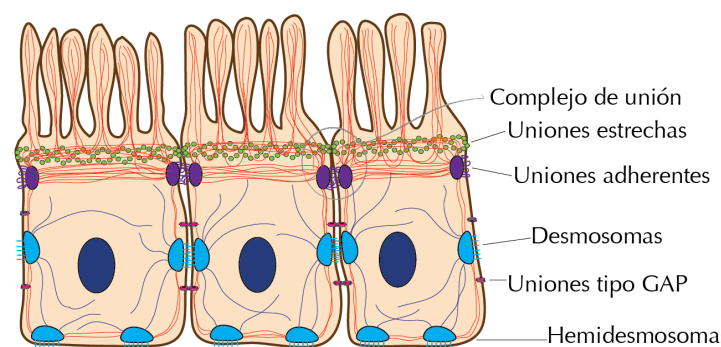


Figura 6: Tipos de uniones intercelulares en una monocapa epitelial. Los filamentos de actina se representan en rojo y los filamentos intermedios, en azul.

• Uniones tipo gap:

Situadas en la membrana lateral de las células, conectan el citoplasma de células vecinas por el espacio intercelular. La unión tipo GAP está formada por la unión de dos hemicanales formados por conexina. Estas uniones permiten el paso

libremente de moléculas de bajo peso molecular (agua, iones, metabolitos y nutrientes menores a 1kDa) entre células vecinas, acoplando la células metabólica y eléctricamente, lo que permite la rápida comunicación entre células necesaria para coordinar procesos como el desarrollo o la regeneración. La respuesta a estímulos externos requiere de una comunicación intercelular bien regulada y esta se produce de dos maneras, a través de las uniones tipo GAP y como secreción paracrina a través de los hemicanales. Se han descrito múltiples conexinas en la córnea en diferentes mamíferos, en el ser humano la más estudiada es la conexina 43. Los hemicanales de conexina 43 se comportan como integradores de la señalización intracelular al permitir el paso de moléculas señalizadoras como el ATP al espacio extracelular. La apertura de los hemicanales se produce por interacciones intramoleculares en el citosol y está regulada negativamente por el citoesqueleto de actina. La unión entre el citoesqueleto y la conexina 43 en los hemicanales es desconocida y, aunque se conocen muchas proteínas citosólicas que interactúan con la conexina, la mayor parte de proteínas se ha estudiado en el contexto de las uniones tipo GAP. En las uniones tipo GAP se produce una interacción entre la conexina y ZO-1, pero esta interacción no se ha demostrado en los hemicanales en el endotelio corneal bovino. La contracción del citoesqueleto contrarresta la apertura de los hemicanales y también afecta a las uniones tipo GAP al producirse una pérdida de las fuerzas de adhesión intercelular de las uniones estrechas con la consecuente pérdida de integridad. Para una descripción más detallada se recomienda la lectura de una revisión por D'Hondt (D'hondt et al., 2014).

En endotelio corneal bovino, aunque la mayor parte de la señalización intracelular de calcio está causada por la secreción paracrina, Gomes ha demostrado la participación de comunicación intercelular dependiente de las uniones tipo GAP (Gomes et al., 2006).

- **Uniones estrechas:**

Las uniones estrechas (TJ) son un componente de la barrera endotelial que conectan las células en la parte mas apical de la membrana lateral. Están localizadas focalmente y sirven para restringir selectivamente la difusión extracelular de algunos iones y macromoléculas. Son agregados supramoleculares formados por proteínas transmembrana (llamadas claudina, ocludina y JAM-A), que se unen a proteínas

asociadas a la membrana como zónula occludens (ZO) 1-2-3 y estas se unen a filamentos de actina. La localización de ZO-1 en epitelios y endotelios con función barrera, como el epitelio intestinal o el endotelio vascular, es exclusivamente en las uniones estrechas (Stevenson et al., 1986), por lo que sirve de marcador de las mismas.

- **Uniones adherentes:**

Se encuentran en la membrana lateral de las células y unen células vecinas anclando el citoesqueleto de las mismas. Se hallan por debajo de las uniones estrechas y forman un cinturón continuo. En la córnea están formadas por heterodímeros de E-cadherina que se unen en el espacio intercelular. Otras cadherinas, como VE-cadherina o la N-cadherina también se expresan en el endotelio de córnea (Zhu et al., 2008). Los complejos de E-cadherina, al igual que el resto de proteínas de esa familia, son dependientes de calcio y se unen en el espacio intracelular al citoesqueleto de actina y miosina a través de complejos con las cateninas y la vinculina (Bazzoni and Dejana, 2004).

- **Desmosomas:**

Al igual que las uniones adherentes, mantienen unidas células vecinas y ambas están compuestas por proteínas de la familia de las cadherinas. Sin embargo, mientras que las uniones adherentes anclan las células al citoesqueleto de actina y miosina, los desmosomas se anclan en los filamentos intermedios. Las uniones intercelulares formadas por desmosomas son fuertes, lo que tiene importancia en tejidos que están sujetos a mucho estrés mecánico, como el corazón o la piel (Green and Simpson, 2007). Al contrario que las células epiteliales, las células endoteliales, como el endotelio vascular o del sistema linfático, carecen de desmosomas (Dejana et al., 1995). Además de su función en la adhesión celular, se ha propuesto un papel como parte de la señalización que está implicada en procesos fisiológicos como la proliferación y la diferenciación (Johnson et al., 2014).

En la Figura 7 se esquematiza el complejo de unión intercelular.

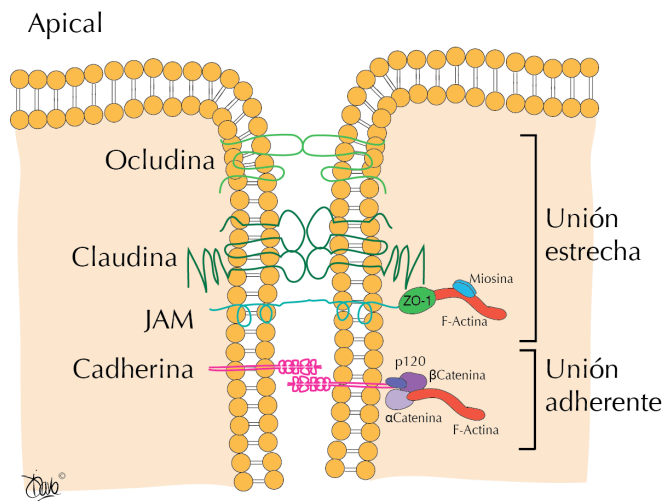


Figura 7: Esquema del complejo de unión intercelular. Las uniones estrechas se localizan cercanas al dominio apical. Las interacciones de las proteínas transmembrana de las uniones estrechas ocluyen el espacio paracelular. Sus componentes citoplásmicos se relacionan con el citoesqueleto de actomiosina por medio de proteínas adaptadoras como ZO-1. Las uniones adherentes se relacionan con el citoesqueleto de manera indirecta, a través de proteínas acopladoras como las cateninas.

Las moléculas transmembrana de las uniones estrechas interactúan con los dominios transmembrana de sus homólogos en las células vecinas. Estas interacciones, favorecidas por las fuerzas de atracción de las uniones adherentes dependientes de cadherinas, ocluyen el espacio paracelular. Las uniones adherentes se sitúan próximas a las uniones estrechas y juntas forman el complejo apical de unión (AJC). En el citoplasma, cada uno de los componentes del AJC forma microdominios que involucran a múltiples proteínas de unión. Los componentes de dichos microdominios están unidos a moléculas señalizadoras, así como al pool proximal del citoesqueleto de actina, que forma una densa banda de actina cortical, que en el endotelio de córnea es llamada anillo de actomiosina perijuncional (PAMR) (Srinivas, 2010).

Los microtúbulos, otro de los componentes del citoesqueleto, son estructuras dinámicas que se extienden en el citoplasma y tienen como función la estabilización de la forma celular, la mediación del transporte intracelular y la localización de organelas. También parece que están implicados en la regulación de la permeabilidad (Jalimarada et al., 2009).

En el endotelio corneal las uniones estrechas representan solo una resistencia débil al paso de agua paracelular, debido a que la distribución de las mismas no es continua (Noske et al., 1994) (Ma et al., 2007). La permeabilidad del endotelio está reflejada en una baja resistencia eléctrica transmembrana y una permeabilidad aumentada, de moléculas de hasta >150 kDa de pm (Maurice and Srinivas, 1994). En comparación con el paradigma de los epitelios permeables, el epitelio del túbulo proximal del riñón, el endotelio corneal tiene una resistencia eléctrica

transmembrana 5-10 veces inferior. La secreción de fluidos es también bastante menor a la del riñón, y el potencial eléctrico transmembrana que genera es tan solo de -0,5mV (Fischbarg, 1972) (veinte veces menos que el del riñón y seis veces menor al del epitelio corneal).

La integridad de la barrera del endotelio corneal no solo reduce la imbibición de agua del estroma por la presión de hinchado, sino que modula la respuesta molecular del mecanismo de transporte iónico y la creación de gradientes osmóticos (Srinivas 2010).

4. Plasticidad del citoesqueleto de actina y su influencia en la integridad de la barrera

1. El aparato contráctil, actomiosina, uniones adherentes y uniones estrechas

Clásicamente, se ha considerado que las interacciones célula-célula eran el resultado de una resistencia pasiva a fuerzas de gran escala que actúan sobre organismos y tejidos. Cada vez hay más evidencias de que mucha de la tensión que mantiene dos células unidas está producida por las propias células, que generan una serie de fuerzas que mantiene a las células vecinas acopladas entre sí (Luo et al., 2013; Gomez et al., 2011).

La adhesión intercelular, mediada fundamentalmente en epitelios de transporte por las uniones adherentes y las uniones estrechas, mantiene a células vecinas acopladas, química, eléctrica y mecánicamente y permite que el aparato contráctil de las células se comporte como una estructura supracelular, teniendo importancia clave en diferentes procesos, como la reorganización celular y la morfogénesis (Martin, 2010).

El citoesqueleto de actina es una red dinámica de filamentos que se encargan de mantener la forma celular, regulan la proliferación y controlan la motilidad celular y la mitosis. En los epitelios polarizados, el citoesqueleto de actina posee distribución espacial distinta en los compartimentos basolaterales y apicales. El

citoesqueleto de actomiosina interacciona con proteínas transmembrana que anclan la célula a las células vecinas y al sustrato. Los filamentos de actina se remodelan gracias a que existe un equilibrio entre la forma globular de actina monomérica (G-actina) y la forma filamentosa (F-actina). La F-actina se asocia con la miosina no muscular que está compuesta por dos cadenas pesadas, dos cadenas ligeras y dos cadenas reguladoras (Vicente-Manzanares et al., 2009).

A nivel celular, la contracción está generada por el sistema de actomiosina, que involucra la interacción de los filamentos de actina con la miosina II no muscular que actúa como proteína motora (Vicente-Manzanares et al., 2009). Cuando experimentalmente se ha inhibido la polimerización de actina con inhibidores o al modificar los reguladores de su polimerización, se observa una disminución de la miosina II en las uniones intercelulares y una alteración de la fuerza contráctil (Leerberg et al., 2014; Wu et al., 2014). Cuando la miosina II se activa, al fosforilarse la región reguladora de la cadena ligera en los residuos Thr18 y Ser 19, forma agregados en orientación antiparalela llamados microfilamentos (Sellers, 1991). Al activarse hay un cambio de conformación y se exponen el sitio de unión a la actina y el dominio ATPasa, ambos localizados en la cadena pesada. Estos polímeros formados por 20-30 unidades de miosina se unen a los filamentos de actina y se desliza por ellos originando la contractilidad (Heissler and Manstein, 2013) (Figura 8).

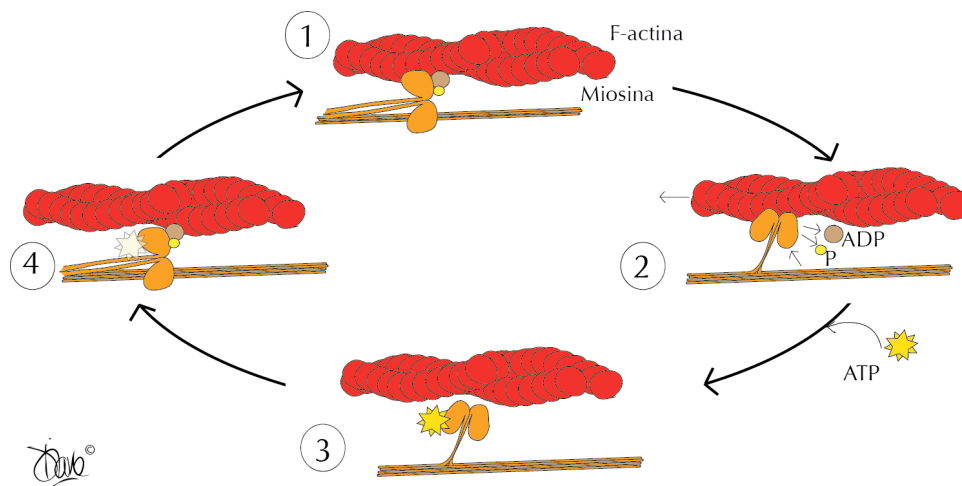


Figura 8: Motor de actomiosina. 1 La cabeza de miosina en conformación de alta energía se une a los filamentos de actina. 2. Después pivota, desplaza el filamento de actina y se libera ADP y fosfato. 3. En configuración de baja energía y unida a ATP, se suelta del filamento de actina. 4. Por último, se hidroliza la molécula de ATP, y la cabeza de la miosina cambia de conformación, lo que permite que la zona de unión a la actina quede expuesta.

La miosina dentro de la célula se organiza formando redes. Existen dos patrones de redes de miosina, las redes apicomediales en las que actina y miosina forman una malla en el polo apical de las células y las redes de unión en las que las fibras de actomiosina se orientan de forma paralela a las uniones (Martin et al., 2009; Wu et al., 2014). En las redes juncionales la miosina no muscular se organiza formando filamentos bipolares de miosina entremezclados con actina y alfa actinina. Estas estructuras de aspecto similar a los sarcómeros se sitúan abarcando desde la parte más basal de las uniones estrechas hasta la parte más apical de las uniones adherentes (Ebrahim et al., 2013). La miosina no muscular tiene un papel en el mantenimiento de la adhesión intercelular y en la desestructuración y reestructuración de las uniones estrechas (Ivanov, 2008). A nivel de las uniones estrechas el citoesqueleto de actomiosina (Liu and Cheney, 2012) y los microtúbulos (Glotfelty et al., 2014) juegan un papel muy importante en la arquitectura y fisiología de las mismas. En las uniones estrechas encontramos numerosas proteínas polimerizadoras de actina como Arp2/3 (Zhou et al., 2013), cortactina (Katsube et al., 1998), WASP (Ivanov et al., 2005) y VASP (Lawrence et al., 2002), así como reguladores de la contractilidad de la actomiosina como las Rho GTPasas (Citi et al., 2011).

Para que la fuerza contráctil se transmita a las uniones y a través de ellas, es necesario que la miosina interaccione con el sistema de adhesión intercelular, y más específicamente con las cadherinas o a sus proteínas adaptadoras, a nivel de las uniones adherentes. A día de hoy no hay evidencias claras de que la miosina II interactúe directamente con las cadherinas o sus proteínas asociadas, de hecho, parece probable que el acoplamiento sea posible gracias a los filamentos de actina. Las cadherinas modulan el ensamblaje y la remodelación de la actomiosina, reclutando de forma directa a proteínas reguladoras de actina o indirectamente a través de proteínas adaptadoras. Esta interacción incluye cascadas de señalización que regulan tanto la actividad como la localización de la miosina II (Shewan et al., 2005) y la asociación de la actomiosina con los complejos de cadherinas (Kraemer et al., 2007).

Hay varias proteínas que pueden actuar como unión entre la actina y E-cadherina: vinculina, cortactina, miosina IV, aunque la más ampliamente estudiada es α -catenina. Esta proteína adaptadora se puede asociar a actina de forma directa o

indirecta a través de otras proteínas. La fuerza contráctil regula la actividad de estas proteínas adaptadoras, cambiando la conformación molecular de la α -catenina, con lo que el número de sitios de interacción α -catenina-F-actina (Drees et al., 2005).

Esta integración de la adhesión y la contractilidad refleja, por un lado, una asociación pasiva de las cadherinas con el citoesqueleto y, por otro lado, un rol activo de la adhesión en el establecimiento del citoesqueleto a nivel juncional.

II. Las cadherinas y la biogénesis del citoesqueleto de actina

La adhesión mediada por cadherinas influencia la formación de las uniones intercelulares por dos vías, actúa a nivel de la señalización de la miosina (Shewan et al., 2005) y regula múltiples aspectos del citoesqueleto de actina (Brieher and Yap, 2013).

- Regulación dinámica del citoesqueleto de actina.

La polimerización de la actina a nivel de la corteza celular y de las uniones intercelulares es un proceso dinámico. Existe un equilibrio entre la elongación de los filamentos y el turnover de los mismos.

El proceso de formación de filamentos de actina está constituido por dos fases.

1.- Nucleación, en la que se unen monómeros de actina para formar unidades triméricas (Blanchoin et al., 2000). Muchas de las proteínas que pueden mediar este proceso se han identificado en las uniones mediadas por E-cadherina. Estas proteínas incluyen al complejo Arp2/3, que favorece la unión de redes ramificadas, estimulado por la familia WASP/WAVE, efectores downstream de Rac y Cdc42 o las forminas, que favorecen la elongación de los filamentos (Chesarone and Goode, 2009).

2.- Ensamblaje postnucleación: en el que se van añadiendo trímeros a los finales de los filamentos. El mejor ejemplo en células de mamíferos son la familia de proteínas Ena/VASP localizadas a nivel de las uniones intercelulares (Barzik et al., 2005), y cuyo reclutamiento a las uniones parece respuesta a un mecanismo de regulación de la tensión (Leerberg et al., 2014).

La forma polimérica de la actina es energéticamente ineficiente, por lo que la tendencia es al desensamblaje. Además de la inestabilidad, hay mecanismos que pueden favorecer el desensamblaje y la remodelación de las redes de actina (Brieher, 2013). Uno de ellos es la fuerza contráctil originada por la miosina II (Reymann et al., 2012). El turnover de la actina puede limitar la fuerza contráctil generada en los epitelios (Wu et al., 2014). Esto implica que existen mecanismos que permiten resistir o compensar el turnover inducido por la fuerza contráctil.

III. El PAMR regula la integridad endotelial en la córnea

La contracción del citoesqueleto de actina cortical genera una fuerza centrípeta que se opone a las fuerzas de unión de las uniones estrechas, generando ruptura de las uniones célula-célula y de la integridad de la función barrera. La regulación de la función barrera por medio del citoesqueleto se ha estudiado en endotelio vascular y otras monocapas epiteliales.

En la regulación de la barrera endotelial están implicados varios mecanismos como respuesta estrés extracelular, factores neurohormonales, factores de crecimiento, productos víricos o bacterianos, citoquinas y nutrientes (Mehta and Malik, 2006; Capaldo and Nusrat, 2009; Bruewer et al., 2006; 2003; Nusrat et al., 2000).

La remodelación del citoesqueleto de actina se ha observado como respuesta a estímulos inflamatorios en el endotelio vascular (Dudek and G, 2001; Marcos-Ramiro et al., 2014). Tras la exposición a agentes que inducen la contracción de la actomiosina o la despolimerización de citoesqueleto de actina, como la citocalasina D, inhibidor de la polimerización de actina, se produce la pérdida de la función barrera (D'hondt et al., 2007). Muchas de las moléculas que actúan en el estrés inflamatorio como trombina, histamina, TNF- α , rompen la barrera a través de mecanismos que incluyen la contracción del PAMR (Srinivas, 2010).

Cuando se produce la disrupción del PAMR, se provoca una pérdida de la función barrera endotelial, la redistribución de los componentes de las uniones, estrechas y adherentes, y la formación de huecos intracelulares. La contracción del PAMR origina una fuerza centrípeta que se opone a las fuerzas de atracción que

mantienen unidas las uniones estrechas y adherentes, siendo las interacciones entre las proteínas transmembrana insuficientes para mantener una interacción estable, por lo que se produce la pérdida de la función barrera. De acuerdo con estos datos, agentes que ocasionan la relajación del PAMR (agentes que elevan el cAMP) parece que se oponen a la pérdida de la barrera endotelial inducida por agentes como trombina o histamina, así como a la remodelación de la misma (Srinivas et al., 2004).

Es curioso que tanto las citoquinas como el estrés oxidativo, aunque no están implicadas directamente en la contracción del PAMR, se ha demostrado que producen redistribución de los componentes de las uniones estrechas y adherentes, por lo que causan la pérdida de la integridad endotelial y disrupción severa del citoesqueleto de actina.

IV. PAMR y la contracción de la actomiosina en el endotelio corneal

La contracción mediada por actomiosina ha sido estudiada específicamente en el endotelio de la córnea. Aunque el conocimiento sobre los procesos de contracción en este tejido es escaso en comparación con otros tipos celulares, las rutas de señalización investigadas por el momento son parecidas a las de otras monocapas confluentes. La contracción de la actomiosina está regulada por la fosforilación de la región reguladora de la cadena ligera de la miosina II (MLC). La cuantía de esta fosforilación está determinada por dos vías opuestas: Fosforilación por la kinasa de MLC (MLCK) y defosforilación por la MLC fosfatasa (MLCP). MLCK se activa al unirse al complejo Ca^{2+} -calmodulina y fosforila MLC. MLC se defosforila por MLCP, un complejo heterotrimérico formado por PP1c δ (subunidad catalítica de MLCP), una subunidad de unión a miosina (MYPT1) y una pequeña subunidad (M21) de función desconocida. La fosforilación de MYPT1 por Rho kinasa inhibe la actividad fosfatasa de PP1C δ . La proteína kinasa C inactiva MLCP a través de la fosforilación de CP1-17, que a su vez inactiva PP1c δ . La activación de Rho kinasa/ PKC origina la contracción de la actomiosina (Srinivas, 2010).

Por el contrario la proteína kinasa A (PKA) se opone a la contracción de la actomiosina. Específicamente fosforila en Ser 188 a RhoA lo que impide la disociación de RhoA GDI (RhoA GDP dissociation inhibitor) de RhoA GDP y por tanto impidiendo la activación de RhoA (Figura 9, adaptada de (Srinivas, 2012)).

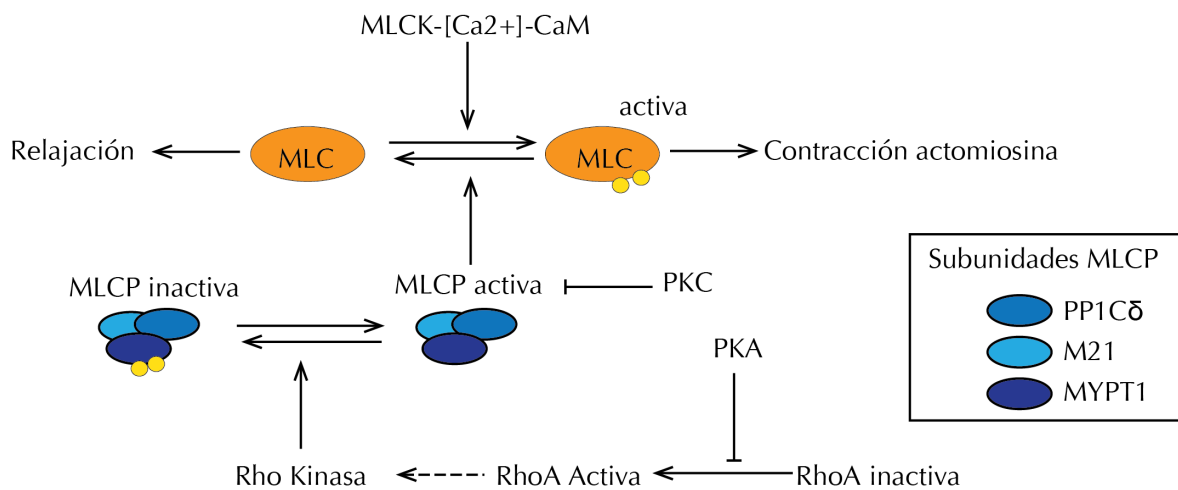


Figura 9: La contracción de la actomiosina está regulada por la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC)

v. Formación y ruptura de las uniones estrechas en el endotelio

Las células endoteliales corneales no se dividen *in vivo*, con lo que la pérdida celular supone una amenaza directa a la integridad de la función barrera. Las células se pierden de forma constante a lo largo de la vida y las células vecinas se expanden para cubrir el área desnuda. Para que se pueda producir esta expansión, son necesarias la desestructuración y la posterior reformación de las uniones intercelulares. La actomiosina es esencial para la formación de AJ y TJ (Ivanov, 2008), lo que le da un papel a la contracción de la actomiosina para la reformación de AJ y TJ que continúa a la expansión celular, inducida por una pérdida focal de células endoteliales.

Srinivas ha estudiado la respuesta del endotelio bovino a la presencia y depleción de calcio midiendo la resistencia eléctrica transmembrana, observando una ruptura de las AJ seguidas de las TJ y la posterior reformación de ambas tras la reintroducción de calcio en el medio (Satpathy et al., 2004). Al retirar el calcio, se

activa RhoA y se desestructuran las cadherinas. Esta activación parece contribuir a la acelerada pérdida de la integridad de la barrera, pues añadiendo Y27632 (un inhibidor selectivo de la RhoKinasa) y blebbistatin (inhibidor selectivo de ATPasa Myosin II) se inhibe la respuesta al deplecionar Ca^{2+} .

5. La familia de Rho GTPasas como reguladores centrales del citoesqueleto de actina

La superfamilia de GTPasas Ras comprende más de 150 proteínas humanas que están divididas en cinco familias: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf. La familia Rho (Ras homologous) está compuesta por proteínas monoméricas de un tamaño medio de 20 KDa que están representadas en la especie humana por al menos 23 miembros, que se pueden dividir en cinco subfamilias: Rho-like, Rac-like, Cdc42-like, Rnd y RhoBTB. De todas ellas, Rac1, Cdc42 y RhoA son las mejor caracterizadas. Las Rho GTPasas regulan la dinámica de actina, la formación de lamelipodios y filopodios y cualquier proceso que requiera motilidad. Esta familia de proteínas también está implicada en otros procesos biológicos que incluyen la dinámica de microtúbulos, la transcripción génica, ciclo celular y transporte de vesículas (Ridley, 2001). Puesto que la función de barrera celular y la estabilidad de las uniones intercelulares dependen de la actina, las Rho GTPasas son también reguladores de estos procesos celulares.

Las Rho GTPasas actúan como interruptores moleculares que integran señales ambientales e intracelulares. La mayoría de las Rho GTPasas ciclan entre un estado o conformación activa unida a nucleótidos de guanosina trifosfato (GTP) y un estado inactivo unido a guanosina difosfato (GDP) (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Su actividad está regulada por tres tipos de proteínas (Figura 10):

1. Los factores de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEF), guanosin nucleotide Exchange Factor, que activan las Rho GTPasas.
2. Proteínas GAP o GTPase-Activating Proteín (GAPs) que activan la hidrólisis del GTP lo que traduce su inactivación.

3. Proteínas reguladoras denominadas (GDI), GDP-dissociation inhibitor, que inhiben el intercambio de GDP por GTP, manteniendo a la GTPasa en estado inactivo en el citoplasma.

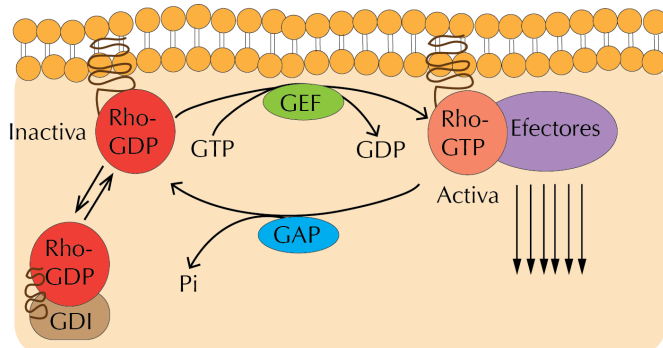


Figura 10: Ciclo de activación de las Rho GTPasas. Estado inactivo, unido a GDP, y activo, unido a GTP. Factor de intercambio de nucleótidos (GEF), proteínas activadoras de actividad GTPasa (GAP) e inhibidor de disociación GDP (GDI).

Las Rho GTPasas actúan normalmente en la membrana plasmática, donde pueden anclarse debido a que están modificadas postraduccionalmente por prenilación. Los principales efectores de Rac y Cdc42 que median la polimerización de actina son la familia de activadores del complejo Arp 2/3 WASP y WAVE, que a su vez pueden regular la actividad de Rac y Cdc42 por unión a proteínas GEF y GAP (Hussain et al., 2001; Soderling et al., 2002). Los principales efectores de Rho que participan en la regulación del citoesqueleto de actomiosina son las quinasas ROCK y las moléculas pertenecientes a la familia de las forminas mDia (Iden and Collard, 2008) (Figura 11).

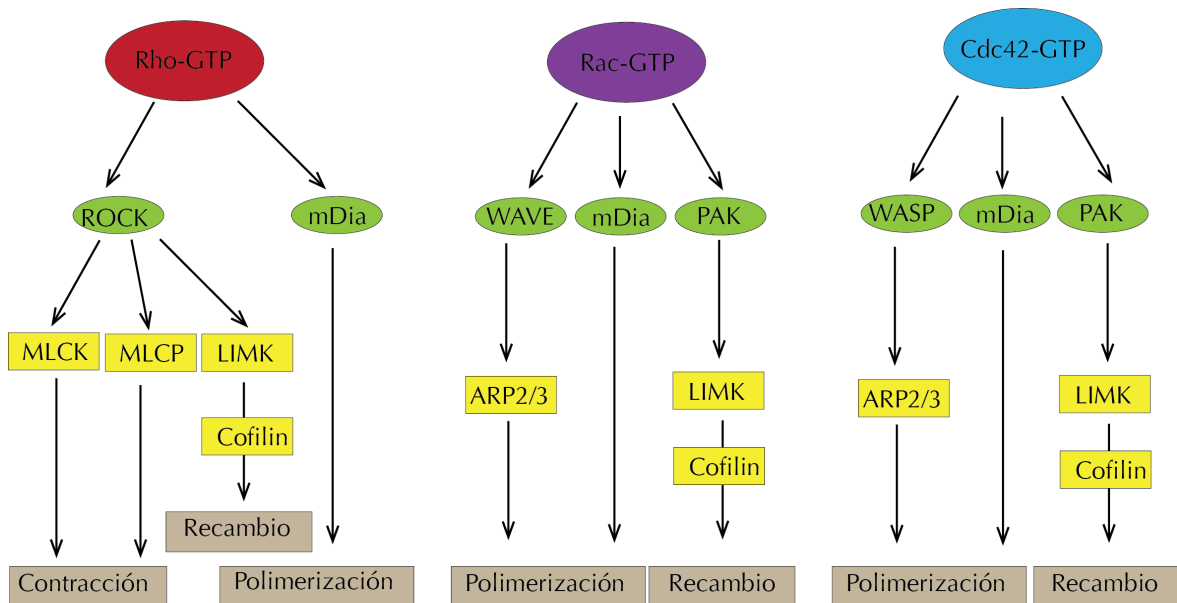


Figura 11: Principales efectores de las tres GTPasas RhoA, Rac y Cdc42 en la regulación del citoesqueleto de actomiosina.

Existe un número creciente de GEFs y GAPs que interaccionan con las Rho GTPasas, muchas de las cuales poseen dominios PH ("Pleckstrin Homology") de unión a fosfoinosítidos, uniéndose a la membrana para ejercer su función (García-Mata and Burridge, 2007).

Las Rho GTPasas se unen y regulan un amplio rango de factores como quinasas, enzimas ancladas a la membrana plasmática y activadores del complejo Arp2/3 o miosinas. De todas las GTPasas, Rac1 está implicada en la formación de lamelipodios, mientras que Cdc42 y RhoG estimulan la extensión de filopodios (Hall, 2012). La activación de RhoA promueve la formación de fibras de estrés y el ensamblaje/desensamblaje de las adhesiones focales. En una célula en migración, Rac1 está activa en el frente de avance regulando este proceso y RhoA está regulando la retracción celular en la parte trasera de esta. De hecho, existe una estrecha comunicación entre ellas para coordinar estos procesos (Burridge and Wennerberg, 2004).

Las fibras de estrés, haces de actina asociados con miosina no muscular son las responsables de la contracción celular. En las células de endotelio vascular se forman fibras de estrés como respuesta a agentes vasoactivos. La señal mejor caracterizada para la formación de fibras de estrés es la fosforilación de la región reguladora de MLC, regulada fundamentalmente por MLCK y por Rho quinasa (ROCK), el principal efector de Rho (van Nieuw Amerongen and van Hinsbergh, 2001). Además, ROCK aumenta la fosforilación de MLC al fosforilar e inactivar a la fosfatasa de MLC (MLCP), enzima que defosforila y por tanto inactiva MLC (Essler et al., 1998) . (Figura 11)

Por otra parte, la formina Dia1 es también un efector de Rho y, al igual que ROCK, también es un regulador del citoesqueleto de actina, siendo Dia1 responsable de la nucleación y formación de filamentos *de novo* (Breitsprecher and Goode, 2013), en contraposición a ROCK, que estabiliza los filamentos ya existentes. Dia1 se ha propuesto como encargado del mantenimiento de las uniones intercelulares, mientras que ROCK está involucrado en la desestructuración de las uniones y disminución de la función barrera. El equilibrio entre la activación de Dia1 y ROCK es lo que determina la acción protectora o disruptora de la función barrera. Gracias a la integración de la

activación de las Rho GTPasas por Rho GEFs localizadas en las uniones intercelulares y de su acoplamiento a señalización de efectores, se genera un mecanismo muy versátil y preciso de regulación espacio temporal (Ngok and Anastasiadis, 2013). En la actualidad existen inhibidores farmacológicos de ROCK pero no se han diseñado todavía para las forminas.

Aunque Rho es el principal miembro que regula la contractilidad, Rac y Cdc42 también están implicadas en el proceso a través de su efector downstream PAK que puede también fosforilar MLC (Goeckeler et al., 2000). Rac se ha propuesto como antagonista de Rho, al disminuir la contractilidad al promover la fosforilación de la cadena pesada de la miosina. Por último Rac1 y Cdc42 activan las quinasas MRCK que controlan también la activación de la miosina tipo II (Schwarz et al., 2012; Unbekandt and Olson, 2014; Prudnikova et al., 2015). Las vías de señalización a la formina Dia y la de Rac1/Cdc42-MRCK-MLC no se han estudiado en el endotelio de la córnea.

En 1995 Nusrat (Nusrat et al., 1995) publicó que las Rho GTPasas controlaban la función de las uniones estrechas y la organización de la actina perijuncional en las células epiteliales polarizadas. Estudios posteriores han contribuido a dilucidar el control de las Rho GTPasas en las uniones intercelulares (Hopkins et al., 2003).

1. La formación de las uniones intercelulares está mediada por las Rho GTPasas

La generación de polaridad apicobasal en células epiteliales requiere de asimetría a lo largo de un eje intracelular que origina dos dominios de membrana. El dominio apical está en contacto con el lumen o el exterior y está especializado en absorción y secreción, mientras que el dominio basolateral media la interacción célula-célula y célula-matriz (Johnston and Sanson, 2011).

Las Rho GTPasas controlan la formación del complejo de unión por tres vías:

1. Estimulación de la polimerización de actina en contactos primitivos célula-célula que son necesarios para estabilizar las adherens junctions y las tight junctions. La polimerización de actina se produce o bien por ramificación de los filamentos ya

existentes gracias a Rac1-WAVE-Arp2/3 y Cdc42-N WASP-Arp2/3 o por la generación de filamentos lineales por Rho-mDia.

2. Estímulo de la actividad de la miosina no muscular que conduce a una expansión y linealización de las uniones estrechas iniciales (Ivanov et al., 2005).

3. Ensamblaje de complejos de polaridad que producen la formación de las TJ y de la polaridad apicobasal (Ivanov, 2008).

La adhesión intracelular comienza con el reclutamiento de nectin a los sitios de uniones intercelulares. Después E-cadherina se agrupa y estabiliza de una manera dependiente de Rac (Tanaka et al., 2003; Giannotta et al., 2013). Para que se estabilice la E-cadherina es necesario que Rac se asocie con su GEF, TIAM1, que a la vez es dependiente de la presencia de Rac1 en la membrana lateral. La actividad de Rac1 en esta zona reorganiza el citoesqueleto facilitando el reclutamiento de la proteína Par3 que inicia la formación de uniones estrechas (Mack et al., 2012) y también regula la formación del complejo WAVE2-Arp2/3 necesario para mantener la integridad de las uniones.

Durante la formación de las uniones estrechas, ZO-1 y cingulin reclutan RhoGEF11 y p114RhoGEF, factores de intercambio específicos de RhoA (Terry et al., 2014). Esta cascada de señalización estabiliza p114RhoGEF en donde se une a la miosina no muscular y ROCK creando un complejo para la activación de RhoA (Narumiya et al., 1999).

Cdc42 se asocia con la proteína de polaridad par6 estimulando así la actividad de PKC y la fosforilación de proteínas de las TJ, como JAM-A o ZO-2, para estabilizarlas (Wallace et al., 2010; Quiros et al., 2013).

La miosina no muscular juega un papel vital en el establecimiento de las uniones intercelulares epiteliales desde la formación de estructuras similares a las AJ seguido de establecimiento de TJ y de la polaridad apicobasal (Heissler and Manstein, 2013). En las uniones inmaduras la miosina no muscular se comporta como una proteína estructural, favoreciendo la formación de fibras de F-actina y estabilizando las uniones de E-cadherina con la subsecuente formación de TJ y establecimiento de la polaridad. Una vez formado el complejo de unión apical, la miosina II, RhoA GAPs regulan negativamente la señalización de Rho y promueven su maduración y mantenimiento del AJC (Chandhoke and Mooseker, 2012).

II. La desestructuración de las uniones intercelulares está mediada por las Rho GTPasas

La desestructuración regulada de las uniones apicales epiteliales facilita la remodelación necesaria para muchos procesos biológicos como la espermatogénesis y la migración leucocitaria a través del epitelio (Gonzalez Mariscal, 2003). Patógenos como virus o bacterias acceden a los tejidos del huésped, ya que son capaces de modular la integridad de las uniones intercelulares. Las citoquinas proinflamatorias liberadas en el epitelio durante la inflamación de la mucosa modulan la actividad de RhoA y por ende la integridad del AJC (Capaldo and Nusrat, 2009).

La miosina no muscular tiene un papel importante en la regulación de la integridad estructural y la función barrera de las uniones en los epitelios transportadores. Muchos de los estímulos que comprometen la función barrera como la depleción de calcio o el tratamiento con citoquinas proinflamatorias activan la miosina no muscular desencadenando la contracción de la actomiosina y alterando la función barrera mediante la disrupción mecánica de las uniones célula-célula unidas a la actina (Marcos-Ramiro et al., 2014).

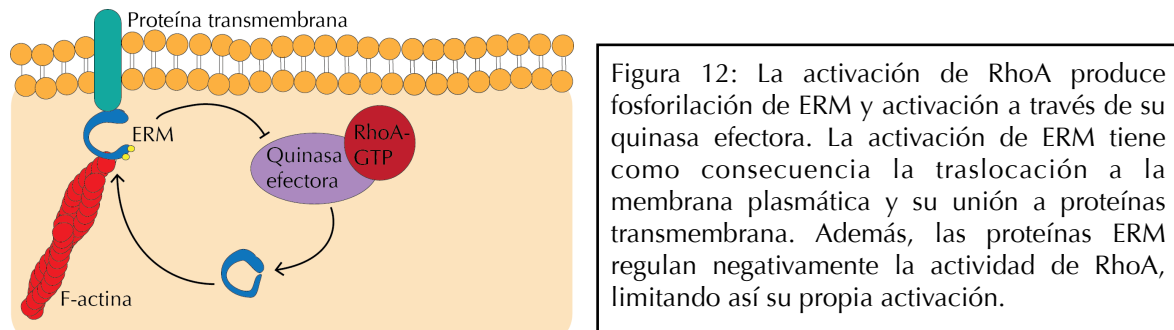
En resumen, las proteínas de las uniones regulan las Rho GTPasas interactuando con sus respectivos GEFs y GAPs y reclutando estas proteínas reguladoras a las uniones intercelulares. Por lo tanto, existe una regulación recíproca, las Rho GTPasas regulan la formación del AJC y el AJC controla el reclutamiento y activación de estas GTPasas.

6. Las proteínas Ezrina/radixina/moesina como interconectores entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina

Las proteínas Ezrina/radixina/moesina (ERMs) son componentes cruciales que interconectan la membrana plasmática con el citoesqueleto de actina e intervienen en varias rutas de señalización celular (Louvet-Vallée, 2000; Mangeat et al., 1999).

Inicialmente descritas por separado, las ERM son proteínas ampliamente distribuidas que regulan la estructura y función de dominios específicos en la corteza celular, siendo componentes de los microvilli presentes en las células epiteliales, endoteliales y sensoriales. Las ERMs pertenecen a la superfamilia de proteínas con dominios FERM (Four Point one, Ezrin, radixin, Moesin), el cual está presente en el extremo N terminal de todas ellas (Ivetic and Ridley, 2004; Ruiz-Saenz et al., 2011). Este dominio es el responsable de la interacción con moléculas de la membrana plasmática y poseen al menos tres secuencias consenso de unión a fosfoinosítidos. Las ERM contienen también otros dominios, uno central denominado alfa-helicoidal y otro dominio de unión a actina en la región C-terminal. Se ha detectado que las ERMs pueden existir en dos conformaciones, una inactiva o cerrada en la que los dominios N y C terminales están interaccionando, ya sea en forma de monómeros o en forma de dímeros, y una forma activa o abierta en la que el dominio de unión a actina y el dominio FERM quedan expuestos para que se produzca la interacción con la actina y la región citoplasmática de proteínas de la membrana, respectivamente. Para que las ERM se activen es necesaria, entre otros factores, la fosforilación de un residuo de treonina conservado (T558 en la moesina, T567 en la ezrina, T564 en la radixina), presente en el dominio C terminal. Esta fosforilación se cree que estabiliza la conformación abierta de las ERM evitando la interacción entre los dominios N y C terminal que dan lugar a la forma autoinhibida (Matsui et al., 1998). Se han identificado varias quinasas, PKC alfa PKC fi y ROCK, que es el principal efector de Rho, que pueden fosforilar in vitro a la moesina y a la ezrina (Figura 12), aunque esto no se ha demostrado in vivo. Del mismo modo las fosfatasas implicadas en la defosforilación in vivo de las ERM son desconocidas, aunque se han sugerido como candidatas las fosfatasas de la miosina y la proteína fosfatasa 2c (Ivetic and Ridley, 2004). Los niveles de fosfoinosítidos, en especial de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2), también regulan la actividad de las ERM. Este lípido presente en la cara citoplasmática de la membrana actúa, o bien estabilizando la forma fosforilada en el extremo C terminal o favoreciendo el cambio conformacional de los monómeros a la forma abierta y activa (Matsui et al., 1999). Se han descrito muchas proteínas que pueden asociarse a las ERM, como los receptores de adhesión ICAM 1-3 (Amsellem et al., 2014; Aranda et al., 2013), CD44 (Orian-Rousseau et al., 2002), L-selectina (Urzainqui et al., 2002) y CD43 (Yonemura

et al., 1998), presentes en leucocitos y células del endotelio vascular. La interacción de las ERM con estos receptores transmembrana también está estabilizada por PIP2 (Heiska et al., 1998).



Las proteínas ERM regulan la barrera endotelial a través de mecanismos poco caracterizados pero que están estrechamente relacionados con la regulación de la unión del citoesqueleto subcortical a la membrana celular. En el endotelio pulmonar las ERM tienen un papel crítico en la reorganización del citoesqueleto de actina tras la exposición a trombina por una vía dependiente de PKC que activa el eje RhoA-ROCK (Adyshev et al., 2013). Y en endotelio vascular la exposición a TNF puede activar a las proteínas ERM alterando la función barrera y la expresión de receptores de adhesión como ICAM-1 (Aranda et al., 2013).

7. Enfermedades endoteliales

1. Endoteliopatías primarias

La forma más frecuente de todas las endoteliopatías primarias es la distrofia de Fuchs, que tiene una prevalencia que se ha estimado en 3,8-11% de los mayores de 40 años (Zhang and Patel, 2015). Es una enfermedad hereditaria y bilateral en las que las células endoteliales se van haciendo gradualmente incompetentes. Empieza a ser sintomática en edades medias de la vida. La densidad celular endotelial disminuye y las células agrandadas restantes segregan cantidades excesivas y anormales de membrana de Descemet. Este tejido anormal aparece como excrecencias (guttas) que se proyectan desde la superficie posterior de la membrana

de Descemet y originan lo que se denomina córnea guttata (Figura 13; Fotografía A reproducida de (Weiss et al., 2008); Fotografía B microscopía óptica del acervo fotográfico de la asociación para evitar la ceguera en México, APEC; Fotografía C extraída de (Reinhard and Larkin, 2007)).

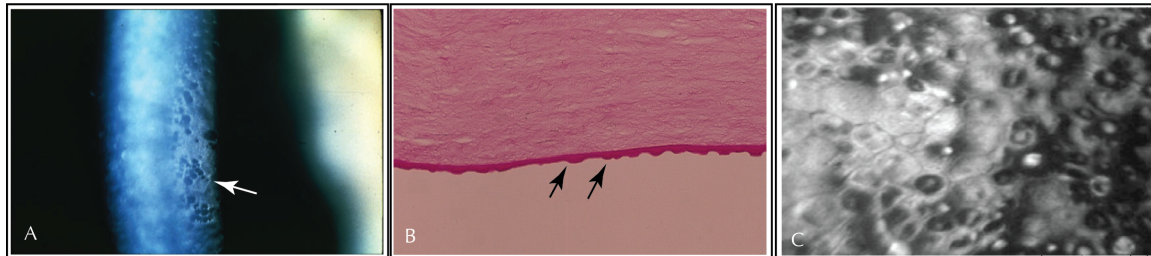


Figura 13 : Distrofia endotelial de Fuchs. A) Biomicroscopía en la lámpara de hendidura (40X). Nótese la apariencia de metal repujado del endotelio corneal (flecha blanca). B) Tinción de un espécimen humano de distrofia endotelial de Fuchs con hematoxilina Eosina. Obsérvense las excrescencias de la membrana de Descemet denominadas guttas (flechas negras). C) Aspecto en el microscopio especular, las guttas se ven como oquedades entre las células sanas.

Las células endoteliales anormales van perdiendo gradualmente su capacidad de bombeo (Wilson et al., 1988). El fallo en la función de bomba endotelial origina una alteración en el control de la hidratación y la córnea se edematiza y pierde transparencia. El único tratamiento del que disponemos actualmente es el trasplante de córnea. De hecho, en 2014 la distrofia de Fuchs representa la indicación de aproximadamente el 47% de los trasplantes endoteliales, y el 22% de todos los trasplantes si se tienen en cuenta todos los tipos de queratoplastia (penetrante, lamelar y endotelial) en Estados Unidos (Park et al., 2015). La base genética de la distrofia de Fuchs es heterogénea y compleja. Las formas tempranas de distrofia endotelial con fenotipo similar al Fuchs presentan un modelo de herencia autosómico dominante y mutaciones en el gen COL82A que codifica una de las cadenas alfa que componen el colágeno tipo VIII (Biswas et al., 2001). Las formas de inicio tardío pueden ser tanto hereditarias con un patrón autosómico dominante como esporádicas, siendo estas últimas las más frecuentes. Es mucho más habitual en mujeres que en hombres (3-4:1), lo que aboga más por una herencia multifactorial. Se han propuesto varios factores de riesgo para el desarrollo de córnea guttata, entre los que se encuentran la edad avanzada, sexo femenino, y grosor corneal central fino (Higa et al., 2011), así como variantes en diferentes genes como ZEB1, AGBL1; LOXHD1, SLC4A11 (Benjamin W Iliff, 2012; S Amer

Riazuddin, 2013). Recientemente, se ha publicado que en la distrofia de Fuchs existe una alteración en las mitocondrias y en la respuesta al daño oxidativo. Si esto es la causa o una consecuencia de dicha dolencia, está aún por dilucidar (Jurkunas et al., 2010; Elhalis et al., 2010). El curso de esta distrofia se puede acelerar tras la cirugía intraocular, especialmente después de la cirugía de catarata. Un recuento endotelial menor a 1000 células/mm² o una paquimetría mayor de 640 μ m se consideran factores de riesgo para la descompensación endotelial (Güell et al., 2014).

La segunda condición, distrofia polimorfa posterior o PPD, es un conjunto de enfermedades hereditarias caracterizadas por la presencia de células epiteliales en el endotelio que pueden aparecer en áreas aisladas así como ocupar toda la superficie posterior de la córnea (Krachmer, 1985).

La tercera endoteliopatía primaria, distrofia endotelial hereditaria congénita (CHED) es como la PPD pero afecta a toda la córnea y es congénita, la córnea está opaca desde el nacimiento. Hay cierto solapamiento entre PPD y CHED, tanto genético (Kanis et al., 1999) como patológico (McCartney and Kirkness, 1988).

El cuarto grupo dentro de las endoteliopatías primarias son los síndromes iridocorneales endoteliales. Estos síndromes comprenden tres entidades que se consideran variaciones de una misma enfermedad, atrofia esencial de iris, síndrome de Chandler y síndrome de Cogan Reese. Suelen ser unilaterales, adquiridos y es más común entre los 30-50 años y en sexo femenino (Shields, 1979). El endotelio tiene un aspecto de metal repujado y las células tienen múltiples características de células epiteliales como microvilli y marcadores de citoqueratinas (Kramer et al., 1992). Aunque la afectación suele ser difusa, es posible que afecte a alguna porción aislada, y en estos casos existe una demarcación clara entre el endotelio normal y el patológico. Estas células ICE anormales se expanden sobre el iris y forman una membrana hacia el ángulo. Esta membrana puede contraerse progresivamente llevando el iris periférico hacia la línea de Schwalbe, formando sinequias que irán gradualmente aumentando. Las células ICE pueden permanecer estables, aumentar y gradualmente extenderse por toda la córnea, o en casos excepcionales regresar (Bourne and Brubaker, 1992). El endotelio del ojo contralateral es generalmente considerado normal, aunque diversos autores han descrito pleomorfismo y polimegatismo sin disminución de la densidad endotelial (Hirst et al., 1980; Kupfer et al., 1983).

Es posible que todas las endoteliopatías primarias compartan alteraciones genéticas similares. Las tres endoteliopatías primarias parecen tener alteraciones genéticas comunes (Biswas et al., 2001) y la CHED ha sido relacionada por algunos autores con el síndrome iridocorneal epitelial (Anderson et al., 2001). Es posible también que una alteración no genética en el desarrollo pueda ser la causa y que la epitelización sea la única respuesta del endotelio a diferentes estímulos (Tetsumoto et al., 1993).

II. Endoteliopatías secundarias

• Lentes de contacto:

Diversos estudios han demostrado cambios histopatológicos, como el edema corneal con el porte de lentes de contacto. El uso prolongado de lentes de contacto origina cambios morfológicos, como aumento del coeficiente de variación (Carlson and Bourne, 1988), o cambios en tamaño y disminución en la hexagonalidad y la densidad celular (Wiffen et al., 2000; Sanchis-Gimeno et al., 2003). Se cree que estos cambios se deben a la hipoxia (Holden et al., 1985), puesto que no se han observado alteraciones en los portadores de lentes de silicona permeables a oxígeno. Incluso a pesar de los cambios producidos en el tamaño y la morfología celular, no parece que el uso prolongado de lentes de contacto produzca una alteración en la capacidad de bomba del endotelio ni en la permeabilidad (Bourne et al., 1999).

• Uveítis:

La inflamación aguda o crónica puede causar daño en el endotelio corneal. El papel del endotelio en las uveítis no se ha estudiado ampliamente, por su dificultad de acceso y por las herramientas, pocas y limitadas para su estudio *in vivo*, como la microscopía especular. Pillai reportó 13 pacientes con uveítis unilaterales de diversas etiologías en los que demostraba alteraciones en el endotelio que incluían disminución de la celularidad endotelial en el ojo afecto (Pillai et al., 2000). En pacientes con uveítis por citomegalovirus se ha demostrado una relación entre la carga viral y la pérdida endotelial (Miyanaga et al., 2010) y en pacientes con ciclitis heterocrómica de Fuchs, en la que se produce una inflamación crónica de bajo

grado se describen alteraciones endoteliales, como polimegatismo y pleomorfismo, y pérdida endotelial mayor que en el ojo contralateral (Miyana et al., 2010; Szepessy et al., 2015).

• Cirugía:

Los efectos de la cirugía de catarata y del trasplante corneal sobre el endotelio se han estudiado ampliamente.

Tras una cirugía de catarata hay una disminución variable en la densidad endotelial que depende del tipo de cirugía (Mencucci et al., 2006).

Una de las complicaciones más frecuentes después de una cirugía intraocular es el edema corneal, que era frecuente en los primeros años de facoemulsificación. Dependiendo del estudio, la pérdida celular central varía entre el 4% y el 25% (Mencucci et al., 2006). Posteriormente, hay una pérdida de 2,5% por año los siguientes diez años, siendo esto hasta cuatro veces superior a la pérdida de una persona no sometida a intervención (Bourne et al., 1997). No se conoce la causa de esta pérdida acelerada, aunque es posible que incluya factores como un cambio en la nutrición por alteraciones en las dinámicas de flujo del acuoso, disminución de la inervación, presencia de inflamación subclínica y contacto con el vítreo.

La tasa de pérdida endotelial varía según el tipo de técnica utilizada y dependiendo del paciente. Por ejemplo, en diabéticos se ha visto una tasa de pérdida mayor que en pacientes no diabéticos (Yang et al., 2011). Curiosamente, la tasa de pérdida en pacientes con bajos recuentos endoteliales es comparable a la tasa de pérdida en pacientes sanos (Hayashi et al., 2011). Durante la facoemulsificación son muchos los factores que favorecen el daño endotelial y se pueden dividir en cuatro grupos:

- a. Daño mecánico directo, al realizar la incisión o por toque inadvertido, ya sea con las instrumentos o con fragmentos de cristalino.
- b. Daño por la energía de los ultrasonidos que afecta directamente al endotelio.
- c. Generación de radicales libres.
- d. Efectos mecánicos y bioquímicos de la solución de irrigación.

En la queratoplastia, la pérdida endotelial inicial depende de los métodos y la duración de la intervención, así como del sistema de conservación del tejido donante. Se ha visto una relación entre tiempo de preservación a 4°C, el método más habitual en Estados Unidos, y pérdida endotelial, siendo esta mayor a mayor tiempo de preservación (Canals and Costa, 1995). Asimismo, se ha descrito una asociación similar en los tejidos conservados en medios de cultivo entre 31° y 37°C, método de preservación más habitual en Europa. Hay estudios sin embargo que muestran que el cultivo frente a la conservación a 4°C favorece la reparación endotelial tras el daño mecánico. Además de permitir un mayor tiempo de almacenamiento, el cultivo se relaciona con una menor tasa de rechazo, sobre todo en pacientes de alto riesgo (Simon et al 2004).

Durante la primera década tras la queratoplastia, la pérdida endotelial anual del lentículo donante es de 4-8% (Ing et al., 1998). Después, la tasa de pérdida se acerca a la tasa normal por el envejecimiento. En una larga serie en la que se comparaba pérdida endotelial en queratoplastia penetrante realizada por el mismo cirujano, se estableció una pérdida inicial de celularidad del tejido donante de 34% en el primer año, 59% a los cinco años y 74% a los 20 años (Patel et al., 2010). En esta serie no se observó diferencia en la tasa de pérdida entre queratocono y distrofia de Fuchs, lo que coincide con otros estudios (Patel et al., 2005). El Specular Microscopy Ancillary Study como parte del Corneal Donor Study, estudio multicéntrico y prospectivo en el que participaban 43 bancos de ojos en Estados Unidos encontró una mediana de pérdida celular tras queratoplastia penetrante del 70% a los cinco años (Cornea Donor Study Investigator Group, 2008). La densidad endotelial en los primeros meses tras una queratoplastia penetrante puede ser un factor predictivo de fallo secundario del injerto, mientras que la predicción de pérdida celular en función de la densidad preoperatoria no lo es tanto. Esta relación indica que la función celular endotelial no se puede predecir únicamente en base a la densidad celular, puesto que en el mismo estudio antes citado encontraron un 14% de injerto transparente con celularidad menor de 500 células/mm² (Cornea Donor Study Investigator Group, 2008).

Al perderse celularidad endotelial, la córnea se engruesa. A pesar de existir un aumento de la función barrera (evidenciada por una permeabilidad a fluoresceína disminuida), la actividad de las bombas está disminuida. Este cambio en la actividad

de la bomba y la permeabilidad se puede explicar por una pérdida del espacio intracelular. Según el endotelio va fracasando, se va desarrollando el fallo endotelial tardío, caracterizado por edema y hace que no responde a corticoides. Este fallo tardío representa más del 90% de los fracasos después de los cinco primeros años post operatorios.

III. Tratamiento de las enfermedades endoteliales

El tratamiento de las enfermedades endoteliales varía en función de su estadio, pudiendo ser suficiente con colirios hipertónicos e hipotensores oculares en los casos más leves, hasta ser necesario el trasplante corneal en los casos más avanzados. En los últimos 50 años la queratoplastia penetrante ha sido el gold standard del tratamiento de las enfermedades endoteliales. A pesar de ofrecer unos buenos resultados funcionales, no está exenta de complicaciones.

Técnicamente, la queratoplastia penetrante es más sencilla que la cirugía lamelar. Sin embargo, para obtener un buen resultado visual es necesario una buena construcción de la herida y una aposición perfecta de la interfase. Para un resultado funcional óptimo la mayor parte de las veces es necesaria la corrección óptica de los astigmatismos inducidos con gafas o con lentes de contacto rígidas. En ocasiones, el astigmatismo post queratoplastia requiere para su corrección de otra intervención quirúrgica, ya sea en forma de cirugía incisional o con el implante de anillos intraestromales (Riddle et al., 1998; Arriola-Villalobos et al., 2009; Fares et al., 2013). Esto propicia que la rehabilitación visual después del trasplante se demore meses después del trasplante o incluso años. Además, la queratoplastia penetrante se puede asociar a complicaciones en la superficie ocular (Mannis et al., 1997), complicaciones derivadas de las suturas (Christo et al., 2001), riesgo de dehiscencia de la herida traumática incluso años después de la queratoplastia (Lam et al., 2007) y en ocasiones excepcionales la hemorragia expulsiva intra o postoperatoria (Price et al., 1994).

Para intentar minimizar las complicaciones asociadas a las queratoplastias penetrantes, en los últimos años han surgido diferentes técnicas lamelares en las que solamente se recambia la parte dañada sin alterar las demás capas. Se han descrito

varios tipos de trasplante endotelial, queratoplastia lamelar endotelial profunda (DLEK), queratoplastia endotelial con pelado de la Descemet (DSEK), queratoplastia endotelial automatizada con pelado de la Descemet (DSAEK), queratoplastia endotelial de membrana de Descemet DMEK, y queratoplastia endotelial asistida por láser de femtosegundo (FLEK). Cada una de estas modalidades difiere en la técnica y presenta sus propias pros y contras. Las queratoplastias endoteliales en conjunto presentan una serie de ventajas frente a las queratoplastias penetrantes entre las que se incluyen una recuperación visual más rápida, una mayor integridad tisular y menor astigmatismo postquirúrgico (Terry and Ousley, 2001). Presentan asimismo un riesgo de rechazo teórico menor, al ser menor la cantidad de tejido trasplantado y estar en una zona de habitual privilegio inmune. Por último, las queratoplastias lamelares permiten el máximo aprovechamiento del tejido donante pudiendo realizar dos trasplantes por cada córnea donante, uno para lamelar anterior y otro para queratoplastia endotelial. Una revisión reciente comparando queratoplastia penetrante vs. endotelial no se evidenció diferencia en la agudeza visual postquirúrgica entre ambos grupos, pero se encontró una recuperación visual más rápida, menores aberraciones de alto orden en el grupo de las endoteliales, así como una pérdida endotelial mayor en el grupo endotelial, quizá porque este grupo incluía diferentes técnicas de queratoplastia endotelial, DSEK, DSAEK y DMEK (Nanavaty et al., 2014). Los resultados presentados en ARVO15 por el grupo de Patel de la clínica Mayo, comparando únicamente DSAEK frente a penetrante después de cinco años, encontraban mejor agudeza visual a los cinco años en el grupo de DSAEK con una tasa de pérdida endotelial similar para ambos grupos.

IV. Tejido corneal donante y banco de ojos

Con los avances en la instrumentación, las técnicas quirúrgicas y el mayor volumen de intervenciones, se hace cada vez más patente la necesidad de un sistema de almacenamiento eficiente de tejido donante. El desarrollo de medios de conservación como el Optisol® y Optisol GS® a principios de los años 90 ha permitido la conservación a 4 °C de tejido de hasta 3 semanas en los bancos de ojos de EEUU, aunque el epitelio sólo se mantiene íntegro alrededor de una semana. Este

medio presenta las ventajas de los medios con condroitín sulfato, como estabilizador de membrana y las de los medios que contienen dextrano, como agente osmótico para evitar el edema del injerto. Además, contiene gentamicina y estreptomicina como antibióticos, indicadores de pH y nutrientes, lo que permite la viabilidad del injerto hasta tres semanas. Aunque se han desarrollado otros medios de conservación, el Optisol® sigue siendo el medio más usado en los bancos de ojos de Estados Unidos (Lee et al., 2013). La mejora en los medios de conservación, así como el uso de métodos objetivos para estudiar la viabilidad de los injertos, como la microscopía especular, ha permitido la mejora en la calidad de los tejidos donantes y en las expectativas y éxito quirúrgico.

En Europa, debido a la necesidad de aumentar el pool de córneas donantes, el método de elección habitual es el medio de cultivo orgánico a 31-37 °C, aunque en España está aún poco extendido. Se basa en la incubación de la córnea en unas condiciones ambientales similares a las fisiológicas. Para ello se utilizan medios de cultivo enriquecido con suero bovino y otros aditivos, como antibióticos o antimicóticos, y 48h antes del implante se pasa a un medio deturgescente, con dextrano a temperatura ambiente para disminuir el edema del tejido. Los medios más utilizados son Endothelial SFM®, Eurosol® o Tissue-C® como medios de cultivo y Carry-C® como medio deturgescente. Se ha comprobado que la pérdida endotelial a los 11 días es similar en medios de conservación en frío y en cultivo orgánico. Existe la posibilidad de pasar una córnea a un medio de cultivo después de su almacenamiento en frío, lo que permite un mayor aprovechamiento de las donaciones (Camposampiero et al., 2003).

La mejora en el manejo y conservación del tejido donante, así como técnicas o estrategias que mejoren el conteo celular postoperatorio pueden disminuir la tasa de fallo endotelial tardío y así incrementar la longevidad del injerto. Se han propuesto varias estrategias para mejorar el conteo del tejido donante. En primer lugar, añadir a los medios de conservación una molécula que impida la apoptosis, como se hizo en la conservación de tejido hepático. Si se necesita inhibición de apoptosis post trasplante, se podría conseguir la transducción de genes como bcl2 o p35 con vectores lentivirales en las células endoteliales durante la conservación (Fuchsluger et al., 2011; Jurkunas et al., 2011). En segundo lugar, el número de células donantes se podría aumentar con el uso de factores de crecimiento o la

pérdida de inhibición por contacto, como se ha usado para inducir mitosis en células endoteliales humanas en cultivo. Finalmente, las técnicas de criopreservación podrían disminuir el deterioro dependiente del tiempo en la preservación (Ben Ali et al., 2009; Bruinsma et al., 2015).

La preparación de injertos precortados en el banco de ojos para la cirugía lamelar ha permitido aumentar la eficiencia de los cirujanos en los trasplantes endoteliales, al eliminar el paso de preparación del tejido en el quirófano, disminuyendo el coste y la necesidad de equipamiento y eliminando el riesgo de desperdicio de tejido por complicaciones en la preparación (Lee et al., 2012). Esto pone de manifiesto la necesidad y la importancia de un buen funcionamiento y formación de los bancos de ojos y de una relación simbiótica entre el banco de ojos y el cirujano, puesto que comparten responsabilidad en el éxito del trasplante.

La falta de tejido donante y la necesidad creciente por el envejecimiento de la población ha propiciado la investigación en el campo de la bioingeniería. El descubrimiento de la capacidad proliferativa de las células endoteliales centrales y periféricas *in vitro* (Joyce and Zhu, 2004; Mimura and Joyce, 2006) con la presencia de determinados factores de crecimiento en el medio de cultivo, ha abierto la posibilidad de terapias regenerativas. Actualmente, la investigación está centrada en encontrar las condiciones óptimas para el aislamiento y cultivo de células endoteliales *ex vivo*, ya sean provenientes de donante o de progenitoras endógenas, y en la búsqueda de la manera óptima de implante, ya sea por inyección directa en la cámara anterior o a través de biomateriales que actúen como transportadores (Bartakova et al., 2014; Zavala et al., 2013; de Araujo, 2015). El mejor conocimiento de la biología y la fisiopatología de la disfunción endotelial abre una perspectiva alentadora en el campo de la medicina regenerativa.



OBJETIVOS



II. OBJETIVOS

1. Objetivo general

- Encontrar y caracterizar un modelo celular humano para el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la integridad del endotelio corneal y su respuesta a estrés.

2. Objetivos específicos

- Caracterizar las condiciones de cultivo de la línea celular HCEC B4G12 como modelo de estudio *in vitro* de la función de barrera del endotelio de córnea humano y su respuesta al estrés.
- Utilizar la línea celular HCEC B4G12 para investigar las rutas de señalización que se activan durante la disfunción de la barrera endotelial en respuesta al estrés osmótico.
- Comparar la respuesta de la línea celular HCC B4G12 con la de células endoteliales de córnea de rodotes humanos o de ojos murinos.
- Buscar inhibidores o activadores farmacológicos de las rutas de señalización inducidas por el estrés osmótico que prevengan la disrupción de la barrera endotelial.
- Generar un modelo animal para el estudio de la función de barrera endotelial de córnea.





MATERIALES Y MÉTODOS



III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Anticuerpos

1.1.1. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios empleados en inmunodetección (WB) y en inmunofluorescencia (IF), se resumen en la tabla 1:

Tabla 1: Anticuerpos primarios

Proteína	Anticuerpo	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
ERK 1/2	Anti ERK	Conejo	Santa Cruz Biotechnology®	1:1000	-
Cdc42	Anti Cdc42	Ratón	BD Transduction Laboratories®	1:1000	-
Rac1	Anti Rac1	Ratón	BD Transduction Laboratories®	1:1000	-
RhoA	Anti RhoA	Ratón	Santa Cruz Biotechnology®	1:250	-
RhoB	Anti RhoB	Ratón	Santa Cruz Biotechnology®	1:250	-
RhoC	Anti RhoC	Conejo	Cell Signaling Technology®	1:500	-
MLC	Anti MLC	Conejo	Cell Signaling Technology®	1:1000	-
pMLC	Anti pMLC	Conejo	Cell Signaling Technology®	1:1000	-
ERM	Anti ERM	Conejo	Cell Signaling Technology®	1:1000	-

Proteína	Anticuerpo	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
pERM	Anti pERM	Conejo	Cell Signaling Technology®	1:1000	-
Ezrina	Anti Ezrin	Ratón	BD Transduction Laboratories®	1:1000	-
Radixina	Anti Radixin	Conejo	Cell Signaling Technology®	1:1000	-
Moesina	Anti Moesin	Conejo	Cell Signaling Technology®	1:1000	-
HSP90	Anti HSP90	Ratón	Santa Cruz Biotechnology®	1:2000	-
ZO-1	Anti ZO-1	Conejo	Invitrogen®	-	1:250
ZO-1	Anti ZO-1	Rata	Developmental Studies Hybridoma Bank®	-	1:250

1.1.2. Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios utilizados en inmunodetección (WB) y en inmunofluorescencia (IF), se resumen en la tabla 2:

Tabla 2: anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
Anti-IgGs ratón 488-555	Burro	Invitrogen®	-	1:500
Anti-IgGs conejo 488-555	Burro	Invitrogen®	-	1:500
Anti-IgGs ratón 647	Burro	Invitrogen®	-	1:500
Anti-IgGs conejo 647	Burro	Invitrogen®	-	1:500

Anticuerpo	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
Anti-IgGs rata 488- 555	Burro	Invitrogen®	-	1:500
Faloidina-TRITC	-	Invitrogen®	-	1:500
Faloidina-647	-	Invitrogen®	-	1:500
Anti-IgGs ratón HRP	Cabra	Jackson ImmunoResearch®	1:5000	-
Anti-IgGs conejo HRP	Cabra	GE Healthcare®	1:5000	-

1. 2 Reactivos

El Colágeno se adquirió a Trevigen®, el Condoitín-6-Sulfato, la fibronectina, la laminina y el bFGF a Sigma Aldrich®. El medio de cultivo Human endothelial-SFM a Gibco Invitrogen®.

El medio de montaje Fluoromont fue adquirido a Southern Biotechnonology Associates Inc.® (Birmingham, AL). La resina glutathione-sepharose fue adquirida a GE Healthcare®. Los reactivos empleados se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3: reactivos

Reactivo	Referencia	Concentración
553513 Ehop-016	Calbiochem®	1µM
Rac1 Inhibitor 553502	Calbiochem®	100-200 µM
TNFα	EMD Millipore Corporation®	50 µg/ml
ML-7	Sigma Aldrich®	10µM
bFGF	Sigma Aldrich®	10 ng/ml
Y-27632 ROCK inhibitor	Calbiochem®	5µM
Blebbistatin	Calbiochem®	50µM
Taxol	Sigma Aldrich®	10µM

Reactivo	Referencia	Concentración
Nocodazol	Sigma Aldrich®	0,2µM
NSC668349 Ezrin Inhibitor	Calbiochem®	1-10µM
Activador RhoA/Rac1/ Cdc42 (Rho Activador I),	Cytoskeleton®	0,2 unidades/µl
Activador RhoA (Rho Activador II)	Cytoskeleton®	0,1 µg/ml

1.3 Oligonucleótidos para PCR cuantitativa

Tabla 4: Oligonucleótidos

Gen	Secuencia 5'-3'
Primers Rac1	Izquierdo: cgccgcttcctatctcag Derecho: tttaacctacagctccgtctcc
Primers Rac2	Izquierdo: cgctctcctatccacagacg Derecho: tcataagaggctgggtgac
Primers Rac3	Izquierdo: acagcgggtcaggaggacta Derecho: cagatcagaaagacgtcagtttg
Primers RhoA	Izquierdo: gaagaggctggactcggatt Derecho: tcaccaacaatcaccagtttct
Primers RhoB	Izquierdo: tatgtggccgacattgagg Derecho: gcggtcgtagtcctcctg
Primers RhoC	Izquierdo: ccggagggtctacgtccctac Derecho: atagtcttcctgccctgctg
Primers GAPDH	Izquierdo: agccacatcgctcagacac Derecho: cgcccaatacgaccaa

Gen	Secuencia 5'-3'
Primers Beta-actina / 18S	Izquierdo: agccacatcgctcagacac Derecho: cgcccaatacgaccaaatt

2. Métodos

2.1. Líneas celulares, cultivos primarios y condiciones de cultivo

- **Cultivos primarios humanos:**

HUVEC (células endoteliales primarias de vena de cordón umbilical)

- **Línea celulares humanas:**

B4G12 (línea endotelio corneal humano)

HepG2 (línea epitelial de hígado humano)

Los cultivos primarios de células endoteliales provenientes de la vena de cordón umbilical (HUVEC) se adquirieron de Lonza® (Basel, Suiza) y se cultivaron en medio EBM-2 de Lonza®, según lo descrito previamente (Millan et al., 2006). Las células se cultivaron en placas incubadas con 10 µg/ml de fibronectina y suplementadas con Suero fetal bovino (FBS) al 2% y suplemento de crecimiento celular endotelial EGM-2 de Lonza®.

Las células HepG2 se obtuvieron de la *America Type Culture Collection* (Manassas, VA). Se crecieron en medio DMEM suplementado con glutamina al 1%, suero fetal bovino al 5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO), 50 U/ml penicilina y estreptomicina 50U/ml (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD).

La línea celular B4G12 procedente del repositorio alemán DSMZ se creció en medio Human Endothelial-SFM® suplementado con 10 ng/ml de bFGF sin antibióticos, según se ha descrito previamente (Valtink et al., 2008)(Valtnik personal communication). Las células se cultivaron en placas incubadas con diferentes sustratos, 10 mg/ml de condroitín-6 sulfato y 10 µg/ml de laminina, 10mg/ml de condroitín-6 sulfato y 100 µg/ml de laminina, 10 µg/ml de fibronectina o colágeno tipo I durante al menos media hora. El medio de cultivo se cambió cada dos días.

Todos los cultivos se mantuvieron en incubadores a 37 °C, con CO₂ al 5% y 95% de humedad. La manipulación de las líneas celulares se realizó en condiciones estériles, una campana de flujo laminar. Las diluciones para mantener las células en crecimiento se realizaron tratando las células con una solución de tripsina al 0,05% y EDTA al 0,02% durante 3 minutos a 37 °C. Posteriormente, se centrifugaron y sembraron con medio fresco.

2.2 Tejidos

- **Tejidos humanos:**

En colaboración con el Hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid, se analizaron muestras de tejido que provenían de rodetes de córneas donantes o lentículos desechados como injerto. Como medio de preservación se utilizó Optisol GS® (Bausch&Lomb®, Rochester NY) para conservación a 4 °C y Tissue-C® (Alchimia, Italia) como medio de cultivo a 31 °C.

- **Tejidos murinos:**

Las muestras de endotelio corneal procedentes de ratones Swiss wild type adultos, proporcionadas por el animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid. Los animales se mantuvieron estabulados en condiciones ambientales estándar (22±2 °C de temperatura, humedad relativa al 70-80%, ciclo de iluminación de 12 horas diarias de luz), con libre acceso al pienso y al agua. El cuidado y tratamiento de los animales se realizó siguiendo la legislación española en “Protección de los Animales Utilizados para Experimentos y Otros Propósitos Científicos”, de acuerdo con las normas de la Unión Europea (O.J. de E.C. L358/1 18/12/1986). Los animales fueron sacrificados por hipercapnia. Como medio de cultivo a 31 °C se utilizó Tissue-C® (Alchimia, Italia).

Extracción y disección de las córneas murinas: Se extrajo el globo ocular entero seccionando el nervio óptico. Una vez extraído el globo ocular se introdujo en una placa con HBSS para su posterior manipulación. Se disecó la esclera por el ecuador y se extrajo el contenido intraocular por la parte posterior. Acto seguido, se fijaron o se mantuvieron en condiciones de cultivo para realizar los experimentos.

2.3. Obtención de extractos proteicos

Los extractos totales de proteínas procedentes de cultivos celulares se obtuvieron tras el lavado de las células dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ pH7,2; 137 mM NaCl y 2,7 mM KCl) y su lisis con solución de Laemmli (Laemmli, 1970), a la que se añadieron los siguientes inhibidores de proteasasa y fosfatasas: 1mM PMSF, 10 mM fluoruro sódico, 10 µg/ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina, 0,3 µg/ml Caliculina A, 1 mM ortovanadato sódico, 10 mM β-glicerol fosfato. Posteriormente, los extractos fueron hervidos para desnaturalizar las proteínas a 95 °C durante 5 minutos.

2.4. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE), electrotransferencia e inmunodetección (Western-Blot)

Los extractos proteicos preparados en solución de Laemmli se analizaron por electroforesis en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) adaptados al sistema de electroforesis Mini-PROTEAN II® (Bio-Rad). Como marcadores se utilizó la mezcla de proteínas de pesos moleculares conocidos comprendidos entre 10 y 250 kDa, Dual Color® (Bio-Rad). Los geles se corrieron a un voltaje constante de 120 V durante 1 hora, en una solución tamponada con 25 mM Tris, 130 mM glicina y SDS 0,1% (p/v).

Las proteínas separadas en geles SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de Immobilon®- PVDF (Millipore) en una solución de Tris-Glicina pH 8,6 y MeOH 20% usando el sistema Mini Trans-Blot® (Bio-Rad). Las transferencias se realizaron durante 1 hora a un voltaje de 100V. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) o con BSA al 5% en caso de querer observar proteínas fosforiladas, en PBS con Tween-20 al 0,05% (v/v), durante 1 hora. Se incubaron con el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C, y después se lavaron durante 10 minutos tres veces consecutivas en PBS con Tween-20 al 0,05% (v/v). Para la inmunodetección de los complejos antígeno-anticuerpo sobre las membranas, se usaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (HRP). Las membranas se

incubaron durante 60 minutos con los anticuerpos secundarios y se lavaron posteriormente 3 veces durante 20 minutos en PBS Tween-20 al 0,05%. La detección de las proteínas se realizó mediante la reacción quimio-luminiscente catalizada por la peroxidasa de rábano unida a los anticuerpos secundarios usando los reactivos ECL® (Enhanced ChemiLuminescence) de Amersham Pharmacia Biotech y película fotográfica de Kodak®.

Para cuantificar la señal de *western-blot* se utilizó el programa Fiji.

2.5. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

2.5.1 Inmunofluorescencia de la línea celular

Las células de la línea celular se crecieron en pocillos de fondo plano de plástico (Ibidi®, Germany) especialmente diseñados para realizar inmunofluorescencias, pretratados con una solución conteniendo los distintos componentes de la matriz extracelular. Las células se incubaron en una disolución de formalina (Formaldehído al 37%; Sigma-Aldrich®) al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se permeabilizaron posteriormente con Tritón X-100, al 0,2% en PBS durante 5 minutos a 4 °C.

Tras la fijación, las células se incubaron en una solución de bloqueo de PBS 1% BSA y 0,02% azida durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con los anticuerpos primarios y secundarios en la misma solución de bloqueo a distintos tiempos y diferentes diluciones según el anticuerpo utilizado e intercalando lavados con TBS entre cada incubación. Finalmente se prepararon las muestras con el medio de montaje Fluoromont (Southern Biotechnology Associates Inc. Birmingham, AL). Los controles para asegurar la especificidad de la inmunofluorescencia se realizaron incubando las células solamente con el primer anticuerpo o bien omitiendo el mismo e incubando únicamente con el secundario.

2.5.2 Inmunofluorescencia de tejidos humanos y murinos

Los tejidos se fijaron con una disolución de formalina al 10% a 4 °C durante toda la noche. Los tejidos fijados se permeabilizaron posteriormente con Tritón X-100, al 0,2% en PBS durante 2 horas a 4 °C. Tras la fijación, los tejidos se bloquearon en una solución de bloqueo de PBS 3% BSA durante toda la noche. A continuación, se incubaron los tejidos con los anticuerpos primarios y secundarios apropiados en la misma solución de bloqueo durante la noche, a diferentes diluciones según el anticuerpo utilizado. Finalmente, se prepararon las muestras con el medio de montaje Fluoromont® (Southern Biotechnology Associates Inc. Birmingham, AL).

Las preparaciones se analizaron en un microscopio confocal LSM 510 acoplado a un microscopio invertido de Zeiss modelo Axiovert 2000. Todas las imágenes obtenidas fueron procesadas empleando los programas LSM 5 Image Browser, Adobe Photoshop 7.0, Adobe Illustrator 10 y cuantificadas con el programa FIJI. Para la cuantificación de la intensidad de actina filamentosa (F-actina) se utilizó la herramienta *threshold*, que permite seleccionar los píxeles a partir de un determinado umbral establecido por el usuario, seguida de la herramienta *analyze particles*, que permite crear regiones a partir de un grupo homogéneo de píxeles seleccionados. Así se crea una región que selecciona específicamente la señal de F-actina. De nuevo, usando las herramientas *threshold* y *analyze particles*, se creó una región que englobaba toda la célula y cuya área fue cuantificada.

Para observar la integridad de la monocapa de manera más clara, se utilizó la herramienta *threshold* seguida de la herramienta *analyze particles* para crear una región que englobara los píxeles menos intensos que se corresponden con agujeros en la monocapa. Para la cuantificación de ZO-1 se midió la intensidad de fluorescencia en la zona perijuncional, tomando como referencia el contorno celular dibujado por la F-actina.

2.6. Ensayos de asociación de proteínas por pull-down con proteínas GST

Los pull down son un método usado para determinar una interacción física entre dos o más proteínas. Esta técnica es útil para confirmar la existencia de una interacción proteína-proteína, así como para detectar la activación de determinadas proteínas.

Las Rho GTPasas actúan como interruptores al ciclar entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. Las formas unidas a GTP se pueden aislar utilizando una proteína recombinante que contiene el dominio de unión a la GTPasa activa de alguna proteína efectora (Figura 14).

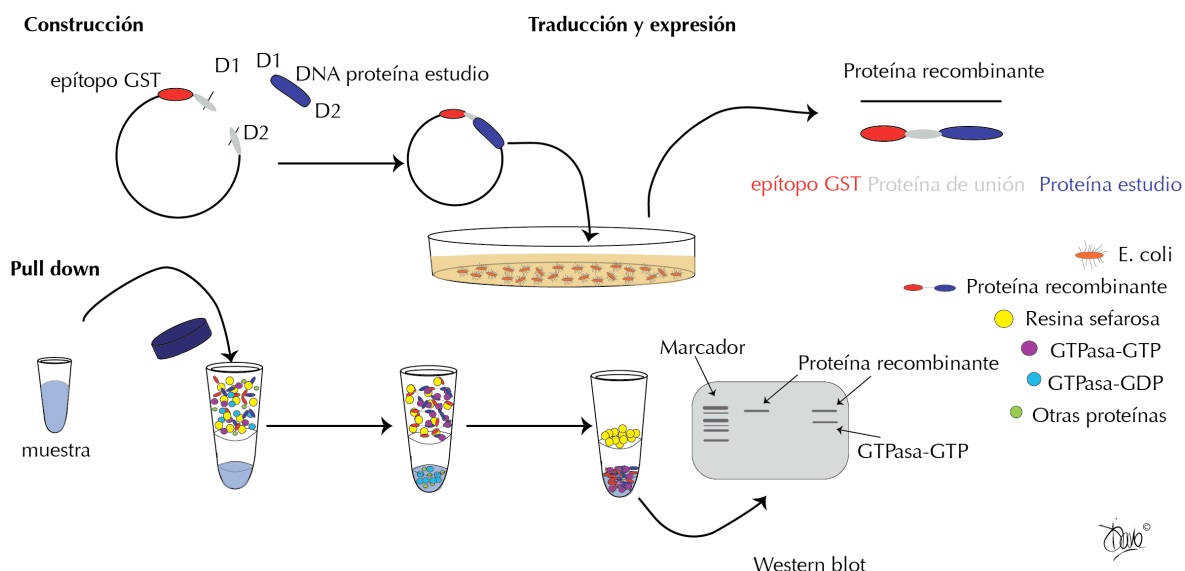


Figura 14: Esquema de la realización de un ensayo de pull down. Construcción de la proteína recombinante. Se inserta el DNA codificando para la proteína de interés en un plásmido que contiene la secuencia codificante del fragmento de unión a glutatión de la glutatión S transferasa (GST). Una colonia de *E. coli* se transfecta con el plásmido y se produce la proteína de interés unido a la proteína GST. Esta proteína quimérica se une a una resina de sefarosa que lleva glutatión. A continuación la resina unida a la proteína quimérica se mezcla con un lisado celular. En el caso de las proteínas GST-RBD o GST-PBD, las Rho GTPasas cargadas con GTP se unen a la proteínas GST inmovilizadas en la resina y son por tanto sedimentadas tras una centrifugación. Posteriormente, se procede a la realización de un *western blot* para su cuantificación.

La actividad de las Rho GTPasas se determinó por *pull-down*, siguiendo un protocolo ya descrito (Ren and Schwartz, 2000). Para aislar Rac1 y Cdc42 activos, se utilizó una proteína recombinante que contiene la región Cdc42/

Rac Interactive Binding (CRIB) (también denominada p21 Binding Domain, PBD) de la proteína efectora Cdc42/Rac p21 activated kinase (PAK).

Para realizar un *pulldown* de la forma activa de Rho, se utilizó una proteína recombinante que contenía la región Rho Binding Domain (RBD) de la proteína Rhotekina, que es un efector de RhoA, RhoB y RhoC.

Todas estas proteínas recombinantes contienen además un fragmento de la Glutathion S-transferasa (GST) que se une al glutathion.

Para purificar las proteínas recombinantes de la bacteria, se indujo su expresión con IPTG en bacterias *Escherichia coli* previamente transformadas con plásmidos inducibles que codifican para estas proteínas. Tras inducir la expresión de estas proteínas, las bacterias se lisaron en buffer PBS frío que contenía detergente (1mM DTT, 1mM PMSF, 0,1% Tween 20 y 10 /ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina en PBS), la parte insoluble se eliminó por centrifugación convencional y el lisado que contenía las proteínas de fusión solubilizadas se incubó con una resina de glutathion-sepharose. La parte GST de las proteínas recombinantes se unió al glutathion y, por centrifugación a baja velocidad, estas se aislaron del lisado bacteriano. La cantidad de proteína de fusión purificada se cuantificó a través de un gel de poliacrilamida, extrapolando el valor a una curva de diluciones de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración conocida (Figura 15).

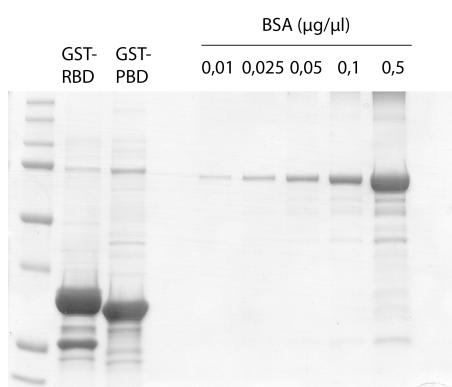


Figura 15: Cálculo de la cantidad de proteína recombinante en un gel de poliacrilamida, por comparación con dilución seriada de BSA.

Para realizar el *pulldown*, las células HCEC B4G12 y HCEC-H9C1 fueron lisadas a 4°C en tampón de lisis (50 mM Tris pH 7.4, 0,5 M NaCl, 10mM MgCl₂, 10% glicerol, 1mM EDTA pH8, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1%SDS, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato sódico y 10 µg/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina) y los lisados aclarados por centrifugación para separar el sobrenadante postnuclear (PNS).

Se utilizó una centésima parte de este sobrenadante para detectar la proteína soluble y el resto del volumen se incubó con 30-50 μg de proteínas recombinantes GST-PBD-PAK o GST-RTK conjugadas a 30 μl de la resina glutatión- sepharosa durante una hora a 4°C en la noria. Posteriormente, la resina se lavó por centrifugación a baja velocidad con tampón de lisis y las proteínas unidas se eluyeron añadiendo tampón de carga Laemmli 12-20 μl , centrifugando 5 minutos a 12000 rpm e hirviendo las muestras a 94° durante 5 minutos. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se detectaron con anticuerpos específicos.

2.7. Ensayos de resistencia eléctrica transmembrana ECIS

Para monitorizar en tiempo real y de forma cuantitativa la función de barrera endotelial, se utilizó el sistema Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) (Applied BioPhysics inc.). El ECIS mide la resistencia transendotelial (TEER), es decir, la resistencia que ofrece una capa confluyente de células endoteliales al paso de una corriente eléctrica débil e inocua para las células.

Las placas 8W10E (8W10E arrays, IBIDI, Martinsried, Germany) (Figura 16) contienen ocho pocillos con diez electrodos en cada pocillo por los que pasa la corriente eléctrica alterna a diferentes frecuencias. Cuando las células crecen sobre los electrodos actúan a modo de aislante aumentando la impedancia. La impedancia de la corriente que atraviesa el medio de cultivo aumenta según aumenta el número de células y su confluencia. Según aumenta la confluencia de las células, la corriente disminuye en función del número de células, la morfología y la naturaleza de sus uniones intercelulares. Cuando las células se estimulan y modifican su forma, se produce un cambio en la impedancia. Con la impedancia se calcula fácilmente la resistencia.

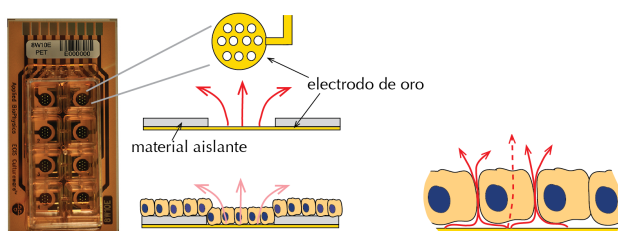


Figura 16: Sistema ECIS. Las placas 8W10E (izquierda) tienen 8 pocillos con electrodos de oro, sobre los que se cultivan las células y se aplica una corriente (flechas rojas). Cuando alcanzan confluencia las células actúan como aislante. El aumento de impedancia depende del número de células y de la naturaleza de sus uniones intercelulares.

La corriente alterna oscila de forma sinusoidal desde frecuencias bajas de unos pocos cientos de Hz a frecuencias de 100,000 Hz. A frecuencias bajas, la mayor parte de la corriente eléctrica fluye a través de los canales por debajo de las células y entre células adyacentes. A frecuencias mayores ($>40,000$ Hz), aumenta la cantidad de corriente capacitativamente a través de las membranas celulares. Si medimos la resistencia/impedancia a baja frecuencia (2000-4000 Hz), esta es proporcional a la integridad de la barrera celular sobre el electrodo (Tiruppathi et al., 1992).

Para llevar a cabo los experimentos, se sembraron 250.000 células por pocillo en la placa de ocho pocillos previamente recubiertas con 200 /ml de fibronectina diluida en agua destilada estéril durante al menos dos horas. Tras cinco días, las placas fueron conectadas al aparato y las células expuestas a los diferentes estímulos. El efecto sobre la permeabilidad endotelial fue medido a 4000 Hz durante al menos tres horas. Todos los datos fueron normalizados antes de proceder a las cuantificaciones en función de la resistencia media de las monocapas endoteliales antes de los tratamientos. El porcentaje de disminución de TEER se calculó restando a la unidad cada valor de resistencia a tiempos fijos y teniendo en cuenta la resistencia del pocillo vacío. El porcentaje de contracción tras la estimulación con el estrés osmótico se calculó restando a la unidad cada valor de resistencia normalizada a tiempos fijos y normalizando en función del valor de resistencia en el máximo punto de contracción de las células control. Un ejemplo se puede ver en la Figura 17.

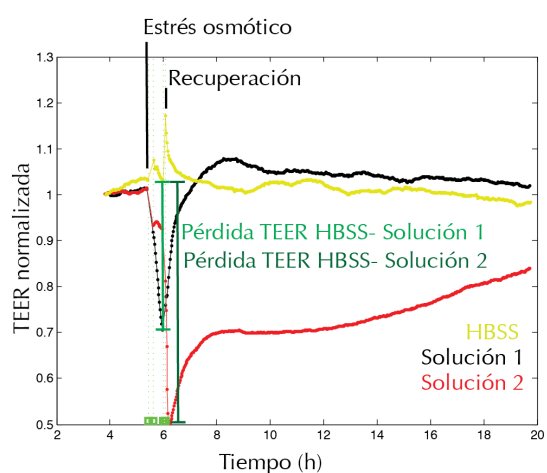


Figura 17: Sistema ECIS. Ejemplo de cuantificación sobre el máximo de reducción de la TEER. Los puntos de corte de estrés osmótico se realizaron al final del estímulo, comparando la pérdida de TEER frente al control (HBSS). Para la comparación de estrés en presencia de inhibidores, se consideró el máximo de reducción de la TEER, el estrés osmótico sin activadores o inhibidores.

2.8. Extracción de RNA y expresión cuantitativa RT-qPCR

Para el estudio de la variación de la expresión de seis genes problema (Rac1, Rac2, Rac3, RhoA, RhoB y RhoC) + tres genes normalizadores (beta-actina, GAPDH y 18S) en muestras basales y estimuladas de endotelio de córnea y vascular humano, se realizó una PCR cuantitativa por el servicio de genómica del CBMSO. Para ello un microgramo de RNA de células HUVEC y un microgramo de células HCEC se sometieron a transcripción inversa con el kit High Capacity RNA-cDNA de Applied Biosystems. El cDNA resultante se utilizó para la RT-qPCR utilizando el SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad®) y los primers forward y reverse diseñados con el software Probe Finder (Roche®) previamente usado en células T (Bhavsar et al., 2013). En paralelo, como controles positivos, se realizaron qPCR para los genes de referencia de beta-actina y de GAPDH y, triplicados de las muestras problemas como controles negativos, para cada punto de estimulación. Los ciclos están en el rango 20-24, lo que indica niveles medios o elevados de dichos transcritos. La cuantificación relativa se realizó con el software GenEx teniendo en cuenta la eficacia de cada pareja de primers, los controles negativos y la contaminación con DNA genómico. La cuantificación relativa se hizo en base a la expresión en el minuto 0 de la estimulación con TNF α . Después, los valores se normalizaron con respecto a las medias de los valores de los genes de referencia en HUVEC cuyo perfil de expresión tras la estimulación por TNF α ya es conocido (Marcos-Ramiro et al, 2016).



RESULTADOS



IV. RESULTADOS

1. Caracterización de la línea celular B4G12 como modelo de estudio de la función barrera del endotelio de la córnea humana.

Las células del endotelio corneal humano tienen capacidad proliferativa limitada *in vivo*. *In vitro* pueden expandirse moderadamente, pero su cultivo en condiciones normales es difícil, ya que sufren con mucha facilidad transformación fibroblástica, por lo que pierden las características del fenotipo endotelial (Okumura et al., 2013; Nakahara et al., 2013; Peh et al., 2011). Una de las estrategias para solventar el problema de la limitada capacidad de proliferación en los cultivos primarios es immortalizarlos y generar líneas celulares que se dividan de forma indefinida y así poder realizar estudios que requieran un gran número de células, como ocurre en la mayoría de los ensayos bioquímicos. En el año 2007, Valtink et al. immortalizaron células procedentes del endotelio corneal de una mujer caucásica de 91 años transfectándolas con el antígeno T del virus SV40 (Valtink et al., 2008). La línea celular que obtuvieron, con características fenotípicas más parecidas al endotelio corneal primario en términos morfológicos y de expresión de marcadores, fue denominada HCEC-B4G12.

La línea celular B4G12 adquiere su máxima confluencia cuando son cultivadas sobre placas de plástico recubiertas con colágeno.

Con el objetivo de investigar los mecanismos moleculares que regulan la función de barrera endotelial en la córnea humana, la línea B4G12 fue adquirida del repositorio oficial alemán de células y microorganismos, DSMZ, y cultivada con éxito siguiendo sus instrucciones (ver materiales y métodos). Con la finalidad de observar células por microscopía de alta resolución, estas son habitualmente sembradas sobre superficies de vidrio de un grosor muy fino que las mantienen planas y no alteran el paso del haz de luz que permite su observación. La membrana

de Descemet que actúa como membrana basal del endotelio corneal, está compuesta por diferentes tipos de colágeno, fundamentalmente colágeno tipo VIII y tipo IV, y laminina aunque también posee fibronectina y otros componentes (Kabosova et al., 2007). Una vez establecido su cultivo en el laboratorio, la línea B4G12 fue cultivada durante una semana sobre cubres de vidrio recubiertos con diferentes componentes de la matriz extracelular, a una concentración de células suficiente para permitir el establecimiento de uniones intercelulares y la adquisición de confluencia. Estudiamos el comportamiento de las células B4G12 cultivadas sobre cubres de vidrio previamente recubiertos con colágeno (150 $\mu\text{g/ml}$), fibronectina (10 $\mu\text{g/ml}$) y laminina (10 $\mu\text{g/ml}$) a concentraciones elegidas de acuerdo con datos bibliográficos previos (Fernandez-Martin et al., 2012; Nishiuchi et al., 2006; Edgar et al., 1984). Como los resultados con laminina fueron en general menos satisfactorios, y la laminina se utilizaba originalmente para el cultivo de la línea celular por parte de sus creadores (Valtink et al., 2008), se analizó un paralelo una concentración diez veces superior de este último componente de la matriz extracelular (100 $\mu\text{g/ml}$). Tras la adquisición de confluencia, las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo específico frente a un componente de las uniones intercelulares estrechas, ZO-1, y con faloidina, una toxina del hongo *Amanita phalloides* conjugada con un fluoróforo, que permite detectar el citoesqueleto de actina filamentosa y, por tanto, la morfología celular (Figura 18A). Las imágenes de confocal fueron procesadas con el software Fiji (Figura 18B, ver materiales y métodos) para obtener una cuantificación del porcentaje del campo vacío de las células sembradas en confluencia en cada condición indicada (Figura 18C). Las células B4G12 cultivadas sobre vidrio desnudo, o vidrio previamente recubierto con colágeno, fibronectina o laminina, no llegaron a establecer uniones intercelulares continuas ni a cubrir por completo la superficie del cubre, ni adquirieron la poligonalidad típica de epitelios y endotelios confluentes (Figura 18A, izquierda, B,C). Puesto que la expansión de la línea celular en las placas de plástico utilizadas rutinariamente para cultivar células adherentes no había producido cambios morfológicos evidentes, a continuación estudiamos la capacidad de la línea celular para formar monocapas confluentes sobre superficies de plástico especialmente adaptadas para microscopía confocal (ver materiales y métodos).

A diferencia de lo observado sobre el vidrio, las células sembradas sobre plástico recubierto por diferentes componentes de la matriz extracelular llegaron a cubrir toda la superficie del cubre y formaron uniones intercelulares más nítidas y adquirieron mayor poligonalidad (Figura 18A, imágenes derecha).

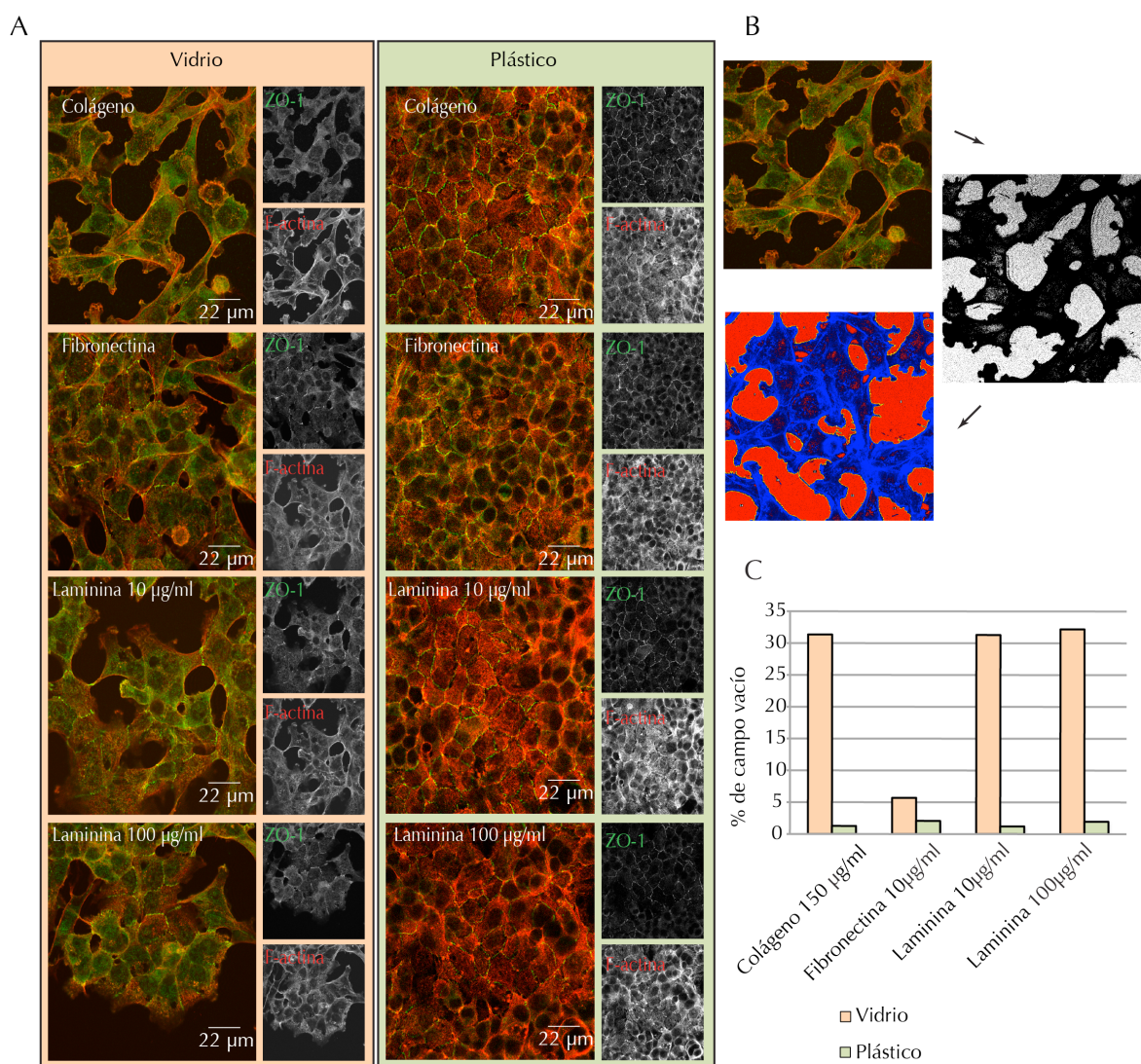


Figura 18: La línea celular B4G12 crece mejor sobre un sustrato de plástico. A) Imágenes de confocal de inmunofluorescencias representativas para valorar el grado de confluencia de las células B4G12 cultivadas sobre placa de vidrio (panel derecho) o sobre placa de plástico (panel izquierdo), cubiertas con 150 µg/ml de colágeno, 10 µg/ml de fibronectina, 10 µg/ml de laminina y 100 µg/ml de laminina. En rojo, F-actina y en verde, ZO-1. B) La cuantificación para cada placa se realizó aplicando una serie de máscaras secuenciales a la imagen confocal con el programa Fiji, los espacios intercelulares se ven en rojo en la última imagen. C) Cuantificación de la confluencia midiendo el porcentaje de campo vacío de células sobre los diferentes sustratos.

El endotelio corneal humano tapiza la cara interna de la córnea formando una monocapa de células. El siguiente paso para la caracterización de la línea B4G12 fue determinar sobre qué sustrato de matriz extracelular (colágeno, fibronectina o laminina, ver párrafo anterior) forman las células una monocapa más similar a la observada en la córnea *in vivo*. Para decidir qué sustrato era el mejor, se cuantificó primero la capacidad de estas células para inhibir su crecimiento en respuesta al contacto entre ellas y se valoró qué porcentaje del campo estaba ocupado por células formando una única capa y qué porcentaje estaba ocupado por células aglomeradas, en multicapa (Figura 19). Según este criterio, la línea celular B4G12 forma mejor monocapas confluentes sobre plástico cubierto con colágeno.

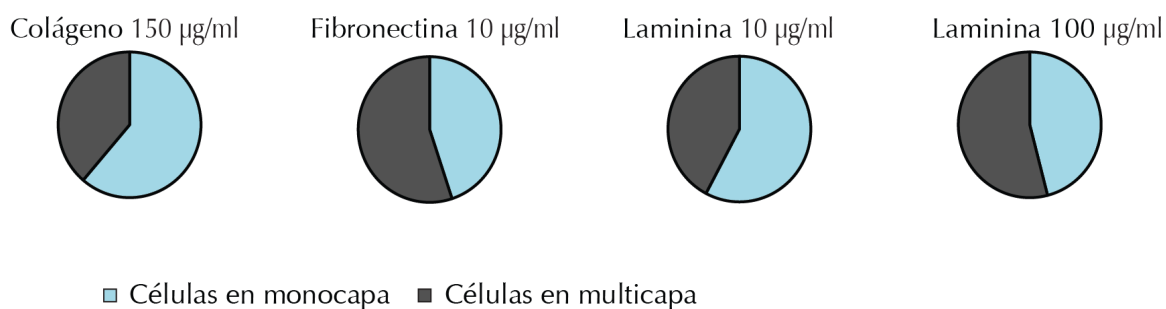


Figura 19: La línea celular B4G12 crece mejor sobre un sustrato de plástico recubierto con colágeno. Representación gráfica de la cuantificación del crecimiento en monocapa de la línea celular B4G12 sobre placa de plástico previamente incubada con diferentes sustratos: colágeno 150 µg/ml, fibronectina 10 µg/ml, laminina 10 µg/ml y laminina 100 µg/ml. En azul se representa el porcentaje del campo en el que las células crecen formando una monocapa y en gris, el porcentaje de células que crecen unas sobre otras.

En condiciones normales, un endotelio sano está formado por células regulares, homogéneas, de forma hexagonal, ya que el polígono que presenta mejor relación de su área respecto a su perímetro es el hexágono. Por ello, se cuantificó también el porcentaje de células de tres o cuatro lados, cinco, seis y siete o más lados. El endotelio perfecto estaría formado por un 100% de células hexagonales, aunque en condiciones clínicas se considera normal un endotelio con una hexagonalidad superior al 50%. Las células B4G12 cultivadas en plástico recubierto por colágeno presentaron la mayor proporción de células hexagonales, de un 40,2%, aunque siempre por debajo del porcentaje de hexagonalidad mínimo del endotelio primario (Figura 20 A,B).

En cuanto al área celular, el área media de la línea crecida sobre colágeno fue de $159,876 \pm 85,7 \mu\text{m}^2$ (rango: $20\text{-}548 \mu\text{m}^2$), sobre fibronectina $203,27 \pm 136,4 \mu\text{m}^2$ (rango: $45\text{-}491 \mu\text{m}^2$), sobre laminina $10 \mu\text{g/ml}$ $213,06 \pm 97,1 \mu\text{m}^2$ (rango: $48\text{-}358 \mu\text{m}^2$) y sobre laminina $100 \mu\text{g/ml}$ $200,51 \pm 108,6 \mu\text{m}^2$ (rango: $42\text{-}415 \mu\text{m}^2$).

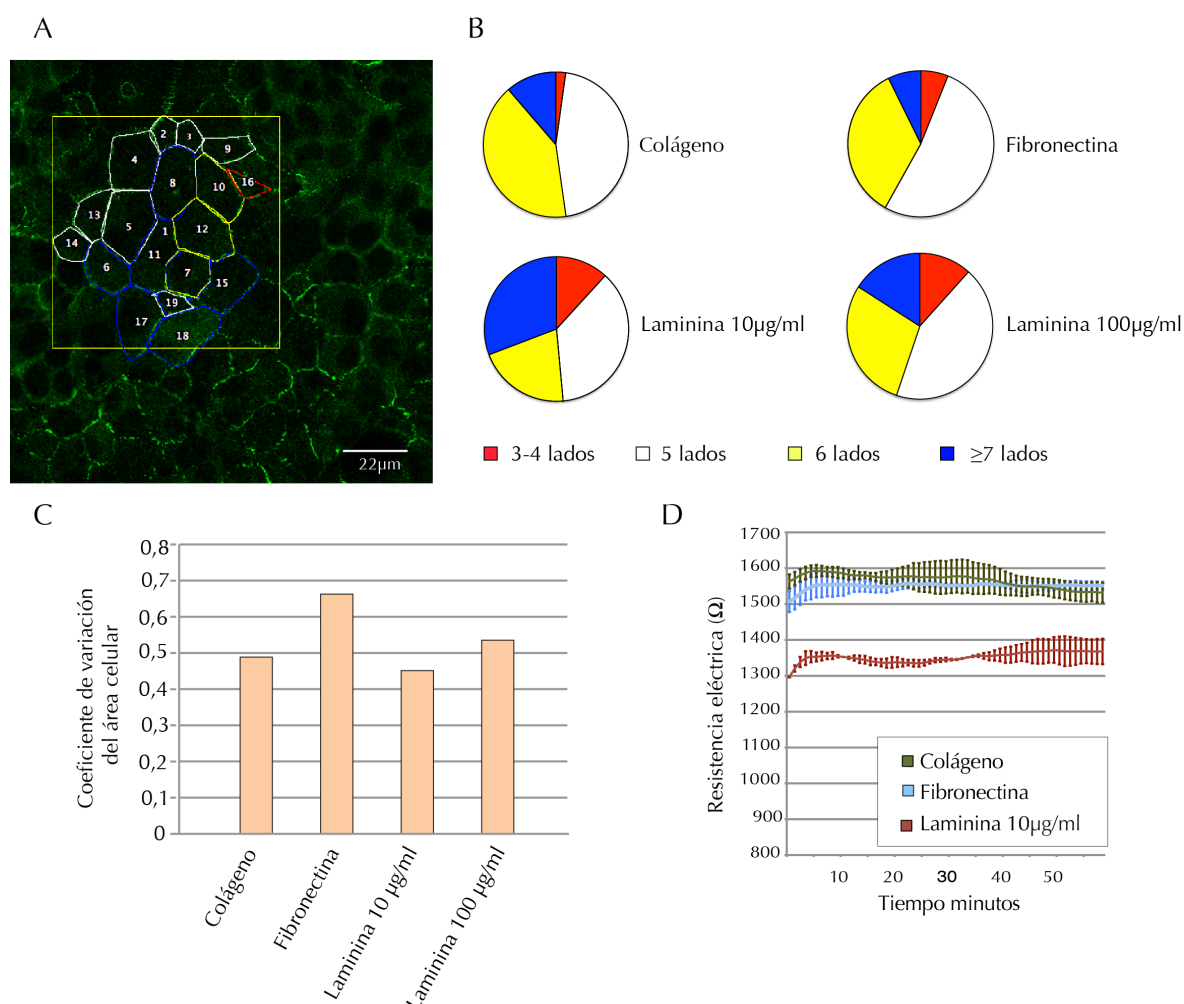


Figura 20: Las características morfológicas de la línea celular B4G12 son más parecidas al endotelio humano *in vivo* cuando crecen sobre colágeno. A) Ejemplo de la medida de la poligonalidad en una inmunofluorescencia de la línea B4G12 crecida sobre laminina $10 \mu\text{g/ml}$. En el canal verde que corresponde a ZO-1 se dibuja el contorno de la célula en rojo si tiene cuatro lados, en blanco si tiene cinco, en amarillo si tiene seis y en azul si tiene siete o más lados. B) Representación gráfica de la cuantificación de la poligonalidad para diferentes sustratos. C) Cuantificación del coeficiente de variación para diferentes sustratos. D) Resistencia transendotelial de la monolapa B4G12 sobre diferentes sustratos.

Para valorar la homogeneidad de las células en cuanto al tamaño, se calculó el coeficiente de variación del área celular (desviación estándar del área celular/ media del área). *In vivo*, se considera normal un coeficiente de variación de 0,4 o inferior,

aunque en los parámetros endoteliales existe gran variación entre diferentes razas y varía con la edad (Rao et al., 2000th; Hashemian et al., 2006; Arıcı et al, 2014; Galgauskas et al., 2013). Obtuvimos un coeficiente de variación menor de 0,5 para células B4G12 cultivadas en plástico recubierto con colágeno o laminina a bajas concentraciones (0,49 para colágeno y 0,46 para laminina 10µg/ml), mientras que las células sobre fibronectina o sobre laminina 100 µg/ml se mostraron más irregulares, con coeficientes respectivamente de 0,67 y 0,54. Estos datos indican que el modelo celular B4G12 tiene una hexagonalidad y una homogeneidad menor que la de células endoteliales primarias humanas (Figura 20A,C). Finalmente analizamos la resistencia transendotelial de la monocapa, que mide de forma indirecta la integridad de la función barrera (Tiruppathi et al., 1992). Las células sembradas a confluencia sobre el sustrato de colágeno y fibronectina, alcanzaron valores similares, siendo esta mucho más baja en el caso de la laminina. estos experimentos en su conjunto indican que las células B4G12 forman una barrera más íntegra y parecida al endotelio primario de córnea humana cuando la línea celular se cultiva sobre colágeno (Figura 20D).

2. Estudio de la respuesta de la línea celular B4G12 a un estrés disruptivo de la función barrera

1. La línea celular B4G12 altera su función de barrera en respuesta al estrés osmótico

El humor acuoso contiene sales, bicarbonato, diferentes componentes electrolíticos y es ligeramente hiperosmolar respecto al plasma (Schaeffer, 1950) con una osmolaridad de 303 mOsm/l (Caprioli, 1992).

El endotelio corneal es capaz de resistir un amplio rango de variaciones osmóticas (Edelhauser et al., 1981), y las células endoteliales expresan selectivamente maquinaria para controlar desequilibrios osmóticos (Gröger et al., 2010). Sin embargo, el estrés osmótico puede afectar a la función del endotelio por dos maneras: afectando a la distribución espacial en mosaico, lo que compromete la

función barrera, y dañando individualmente a las células que reducen su capacidad de bombear iones y de deshidratar activamente el estroma. La tolerancia osmótica medida experimentalmente en endotelio de conejo está relacionada con la temperatura y la duración del estímulo anisomótico (Armitage et al., 1988).

Para valorar la respuesta del endotelio corneal y su función barrera frente a diferentes estímulos osmóticos, se realizaron experimentos de medición de la resistencia eléctrica que ofrece la monocapa de células al paso de la corriente eléctrica. El dispositivo ECIS monitoriza la resistencia celular a través de monocapas en tiempo real de manera no invasiva. Mide la resistencia que ofrecen las células al paso de la corriente eléctrica, que es proporcional a la integridad de la barrera. Un aumento de la permeabilidad paracelular se correlaciona con un descenso de la resistencia transendotelial. Se sembró la línea celular sobre los electrodos y una vez alcanzada la confluencia (alcanzada a los 7 días), se realizaron los experimentos.

Para estudiar el efecto del estrés osmótico, utilizamos como modelo diferentes soluciones: como medios hipertónicos empleamos HBSS, al que se añadieron diferentes osmolitos, manitol al 10 y al 20% y NaCl a 150, 300 y 600 mM, y como medio hipotónico se utilizaron diluciones de HBSS con agua destilada (25 y 50%). Una vez alcanzada la confluencia sobre los electrodos, tras siete días en cultivo, la resistencia basal de la monocapa fue 1647 +/- 253 Ohmios.

Tras media hora de estabilización en el incubador dentro de la terminal de medición, se retiró el medio de las células y se cambió por las diferentes soluciones. Después de exponer estas barreras durante diez minutos a los diferentes medios, se observó una disminución de la resistencia tras la adición de medios hipertónicos y un aumento de la resistencia tras la adición de medios hipotónicos. La resistencia volvió a valores normales después de retirar el medio y sustituirlo por HBSS, de osmolaridad dentro de valores fisiológicos, lo que indica que los diferentes tipos de estrés alteran significativamente la supervivencia celular (Figura 21).

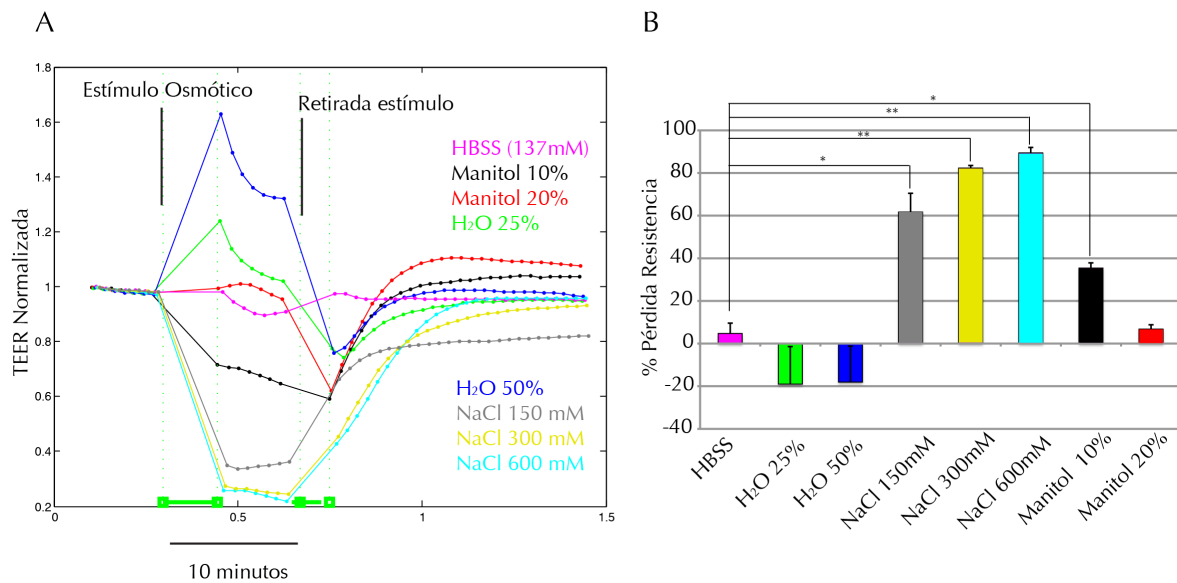


Figura 21: El estrés osmótico altera la función barrera de la monocapa endotelial. A) Las células se incubaron con los diferentes estímulos osmóticos durante 10 minutos y a continuación se cambió el medio por HBSS. La resistencia transendotelial (transendothelial electric resistance, TEER) disminuye con los estímulos hipertónicos y aumenta con los hipotónicos. Tras la retirada del estímulo, la resistencia transmembrana se recupera total o parcialmente. B) Representación gráfica de la pérdida de resistencia eléctrica de la monocapa con los diferentes estímulos osmóticos. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos; * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

II. El choque osmótico altera las uniones intercelulares e induce la polimerización de actina

El choque osmótico produce alteración en la función barrera. Hay múltiples mecanismos que están implicados en la regulación dinámica de la permeabilidad de las monocapas epiteliales/endoteliales frente a diferentes estímulos, neurohormonales, estrés extracelular, citoquinas, factores de crecimiento, etc. Un mecanismo central en la alteración de las barreras celulares es la estimulación de la contracción mediada por el citoesqueleto de actomiosina (Srinivas, 2010).

Para ver el efecto del estrés osmótico sobre el citoesqueleto de actomiosina y su efecto en las uniones estrechas (Figura 5A), se realizaron inmunofluorescencias de la línea celular B4G12 sometida a diferentes choques osmóticos con anticuerpos específicos de ZO-1 y con faloidina fluorescente.

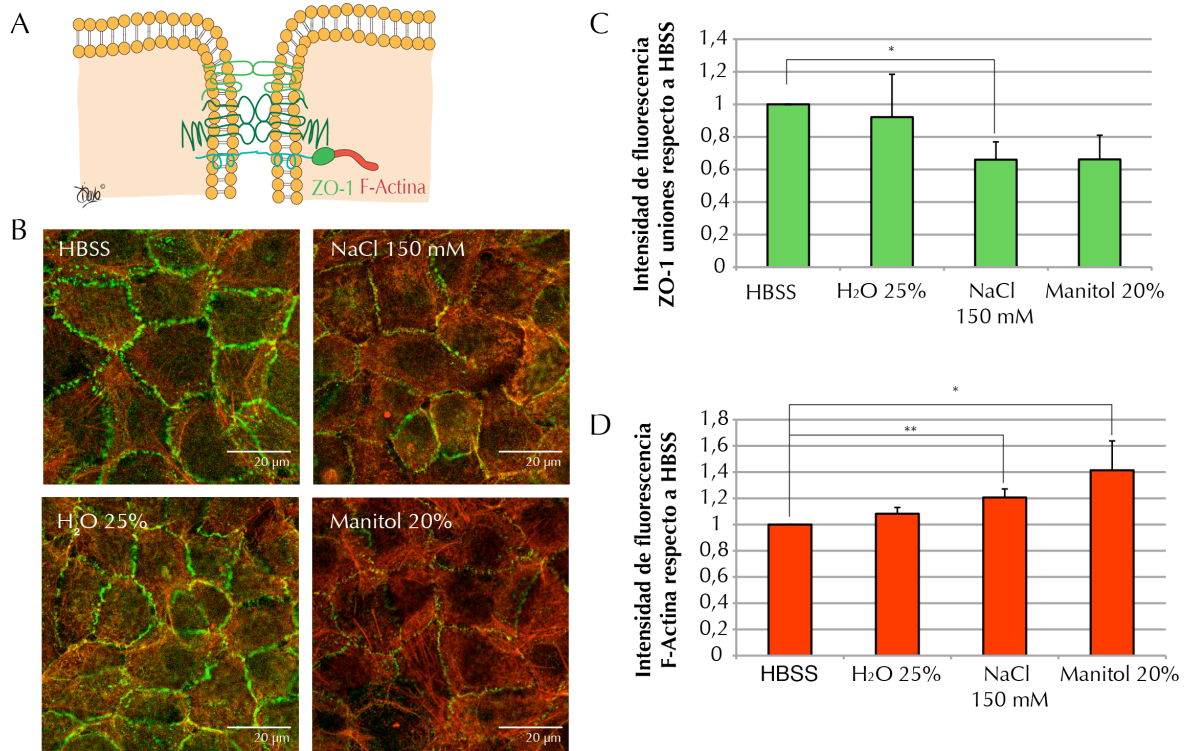


Figura 22: El choque osmótico altera las uniones intercelulares e induce polimerización de actina. A) Esquema de las uniones estrechas. Las proteínas transmembrana se unen al citoesqueleto de actina por medio de proteínas conectoras como ZO-1 B). Las células B4G12 en monocapa se estimularon con las diferentes soluciones osmóticas durante diez minutos. A continuación, se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con un anticuerpo monoclonal específico para ZO-1 hecho en ratón, seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón unido al fluoróforo Alexa 488 (verde). La F-actina se detectó con faloidina unida al fluoróforo TRITC (rojo). C) Representación gráfica de la disminución de la fluorescencia de ZO-1 en las uniones intercelulares frente a los diferentes estímulos osmóticos. D) Representación gráfica del aumento de la fluorescencia de F-actina frente a los distintos estímulos osmóticos. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

El efecto del choque hiperosmótico sobre la barrera endotelial alteró las uniones intercelulares estrechas, observándose una disminución de la intensidad de ZO-1 en los bordes de las células (Figura 5B,C). Tomando la intensidad de fluorescencia de ZO-1 en las uniones intercelulares como 1 para las células incubadas con HBSS, un exceso de un 25% H₂O no indujo cambios significativos en dicha intensidad (0,92; $p=0,38$). Sin embargo, un incremento de 150 mM NaCl en la solución salina o la adición de un 20% de manitol, redujo la fluorescencia de ZO-1 hasta 0,66 ($p=0,017$) y ($p=0,07$), respectivamente. Por otra parte, la cuantificación de la fluorescencia en las tinciones de faloidina reveló además que el choque hiperosmótico con un incremento de 150 mM de NaCl genera un aumento de la actina filamentosa (Figura 22B,D) de entre 1,2 y 1,4 veces ($p=0,043$).

Como validación de los datos experimentales, se realizaron experimentos con córneas humanas. Se utilizaron rodetes sobrantes tras la extracción del lentículo central para su posterior implante o lentículos luxados tras un implante endotelial. La dificultad de obtención de tejido humano por el mayor aprovechamiento del tejido al ser cada vez más frecuente la realización de trasplantes lamelares, la dificultad en el manejo y montaje de las muestras, así como la falta de control sobre factores determinantes de la supervivencia celular como tiempo muerte-extracción-conservación, antes de realizar los experimentos controlados, hacen que el número de experimentos con córneas humanas no sea suficiente para hacer una estadística. Sin embargo, los experimentos realizados muestran resultados similares a los obtenidos con la línea celular (Figura 23).

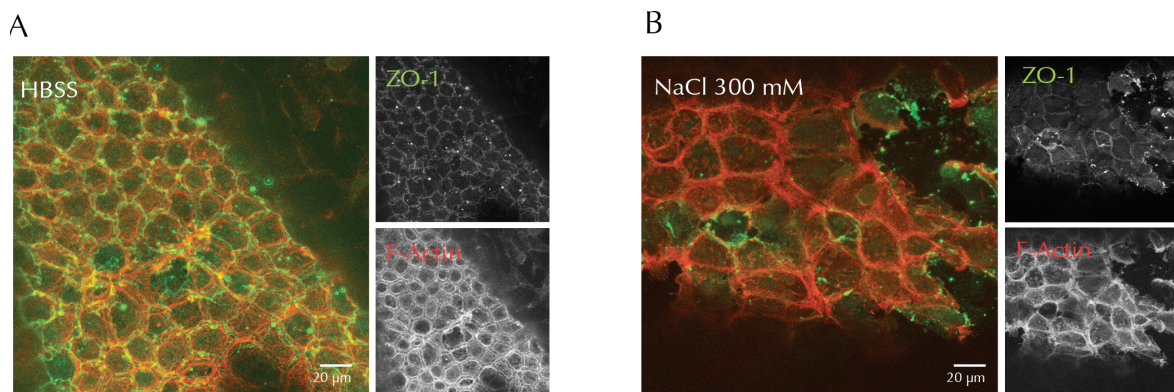


Figura 23: Inmunofluorescencia de córneas humanas observada por el microscopio confocal. El tejido se expuso a estrés osmótico con un exceso de 300 mM NaCl durante diez minutos y después se fijó con una disolución de formalina al 10% a 4°C durante toda la noche. Los tejidos fijados se permeabilizaron durante 2 horas a 4°C y se bloquearon durante toda la noche. A continuación, se incubaron los tejidos con anticuerpo monoclonal contra ZO-1 seguido de un anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa 488. F-actina se detectó con faloidina-TRITC. Tras la exposición a estrés hipertónico (B), se observa una desestructuración de las uniones estrechas con una disminución de la intensidad de fluorescencia de ZO-1 a nivel de las uniones y un aumento de la F-actina frente al tejido control con HBSS en (A).

Tras la adición de un estrés hiperosmótico, se produjo una desestructuración de las uniones intercelulares con una disminución de la intensidad de ZO-1 a nivel de las uniones intercelulares y un aumento de la actina filamentosa.

III. El choque hiperosmótico aumenta la fosforilación de la cadena ligera de la miosina no muscular de tipo II

La fosforilación en los residuos Ser-19 y Thr-18 de la cadena ligera de la miosina propicia la interacción con la actina, la formación de fibras de estrés y de otros filamentos de actina gruesos implicados en procesos de contracción celular como el anillo contráctil en células no musculares (Figura 24A) (Kamm and Stull, 2001). Por tanto, la cuantificación de dicha fosforilación refleja cuantitativamente la contracción mediada por actomiosina (Marcos-Ramiro et al., 2016).

Para estudiar el efecto del estrés osmótico sobre la fosforilación de MLC, se realizaron lisados celulares tras someter a las células a estrés osmótico similar al de la Figuras 4 y 5 y se inmunodetectó la fosforilación de MLC mediante western blot de estos lisados con un anticuerpo específico frente a las dos serinas fosforiladas y con otro anticuerpo que reconoce el total de MLC. Tras la adición de medio hiperosmolar detectamos un aumento de la fosforilación en dichos residuos (2,07 en NaCl 150 mM vs. 1 en HBSS $p=0,008$), mientras que tras la adición de estímulos hipoosmolares se produjo un descenso de la fosforilación de la misma (0,57 en H₂O 25% $p=0,046$) (Figura 24B,C). Se utilizó un anticuerpo frente a la proteína citoplasmática ERK, cuyos niveles de expresión son estables, como un control para comprobar que cada carril del western blot tuviera la misma carga de proteína del lisado celular (Figura 24B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los experimentos previos, en los cuales observamos un aumento de F-actina en respuesta a estímulos hiperosmóticos pero no en respuesta a estímulos hipotónicos (Figura 22). Este aumento de fosforilación se reveló como un evento temprano, siendo mayor en el primer minuto de choque osmótico.

Como validación en células humanas primarias, se realizaron lisados de la córnea central de un lentículo humano desechado para trasplante y se observó un aumento de la fosforilación de MLC tras el choque osmótico (Figura 24D).

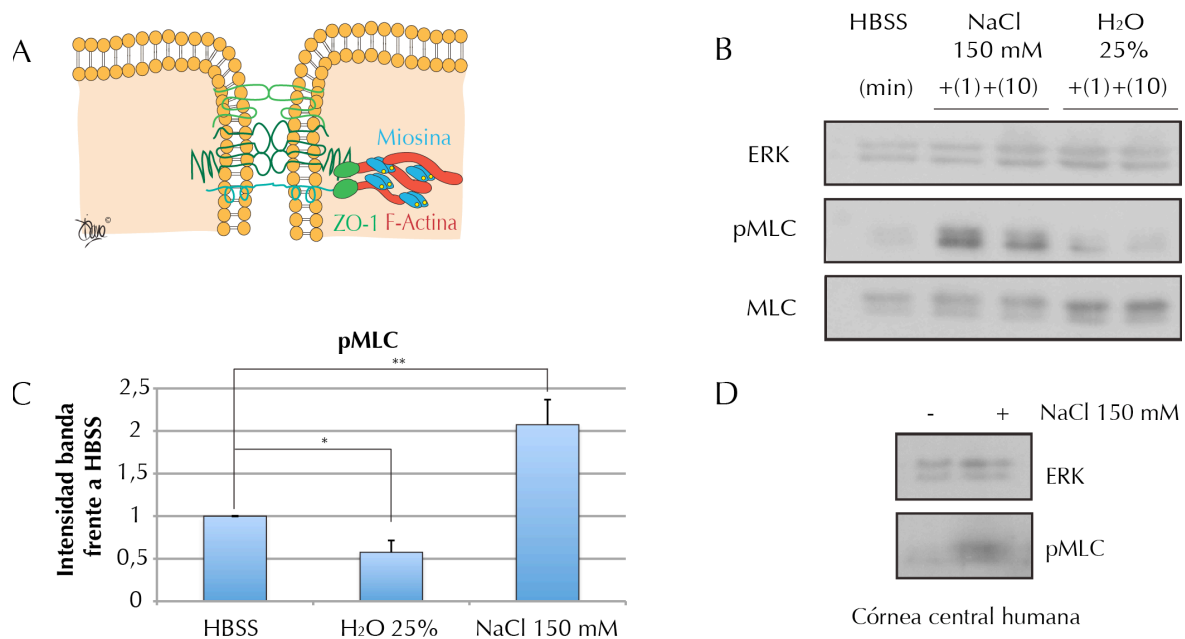


Figura 24: El choque hiperosmótico aumenta la fosforilación de la cadena ligera de la miosina no muscular tipo II. A) Esquema de las uniones estrechas. La miosina fosforilada sirve de unión entre filamentos de actina. B) Expresión de pMLC y MLC en la línea celular B4G12, tras la adición de NaCl 150 mM durante 1 y 10 minutos, y de agua destilada al 25% durante 1 y 10 minutos. C) Cuantificación de la fosforilación de MLC tras la adición de estímulos osmóticos frente a HBSS. D) Immunodetección de la fosforilación de MLC en un lentículo corneal humano tras diez minutos de exposición a NaCl 150 mM. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

IV. El choque hiperosmótico activa ezrina, radixina y moesina, tres reguladores de la rigidez celular

La familia de proteínas Ezrina/radixina/moesina (ERM) interactúa directamente con los filamentos de actina actuando como unión entre el citoesqueleto y la membrana plasmática (Fehon et al., 2010). La conformación está fosforilada en un residuo treonina en cada una de las tres proteínas ezrina, radixina y moesina (T567, T564, T558, respectivamente). Al fosforilarse, las proteínas ERM cambian a una conformación abierta y se unen a la actomiosina anclándola a la membrana (Figura 25A). Esto hace que las proteínas ERM participen en la regulación de la tensión a la que las células se ven sometidas en respuesta al estrés, controlando la rigidez de la superficie celular y la permeabilidad (Kunda et al., 2008; Titushkin et al., 2013;

Aranda et al., 2013). Estas proteínas están involucradas, por otra parte, en la regulación de las Rho GTPasas, reguladores maestros del citoesqueleto. Diferentes estudios han demostrado la interacción de las proteínas ERM con proteínas reguladoras de las Rho GTPasas, como RhoGEF, RhoGAP y RhoGDI (Ivetic and Ridley, 2004; Dovas and Couchman, 2005). De forma recíproca, la ruta de señalización controlada por la subfamilia RhoA de GTPasas y la quinasa ROCK media la activación de las proteínas ERMs (Aranda et al., 2013).

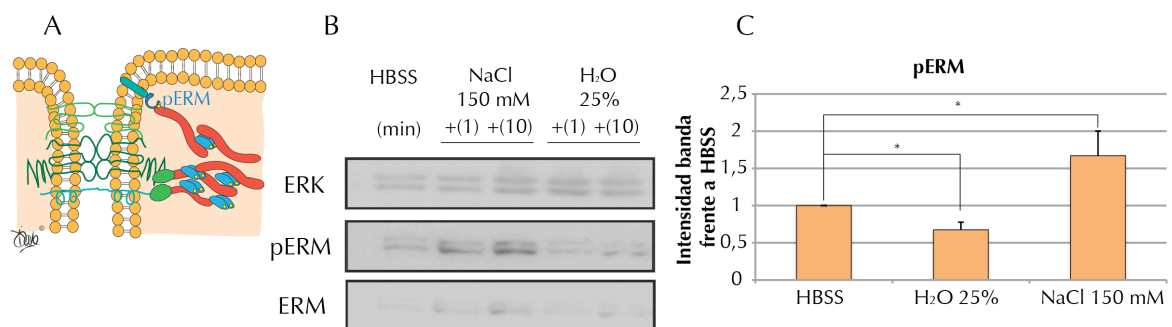


Figura 25: El choque hiperosmótico activa ezrina, radixina y moesina. A) El complejo ERM fosforilada (activa) sirve de unión entre la membrana plasmática y los filamentos de actina y, por tanto, controla la rigidez celular. B) Inmunodetección de la expresión de ERM y pERM en la línea celular B4G12 en un medio isotónico de HBSS, tras la adición de un exceso de NaCl 150 mM como estímulo hipertónico, durante 1 y 10 minutos, y de un exceso de 25% de H₂O como estímulo hipotónico, durante 1 y 10 minutos. C) Representación gráfica de la fosforilación de ERM tras la adición de estímulos osmóticos (NaCl 150 mM y H₂O 25%) frente a HBSS. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos. *p<0.05; **p<0.005.

Por tanto, decidimos analizar el efecto del choque osmótico sobre la activación de las proteínas ERM siguiendo su fosforilación en los residuos de treonina con un anticuerpo específico. Tras la adición de estímulos hiperosmóticos, observamos un aumento en la fosforilación de ERM (1 en HBSS vs 1,67 en NaCl 150 mM, p=0,043). Por otro lado, tras la adición de estímulos hipoosmolares, detectamos una disminución de la fosforilación de dichas proteínas (0,67 en H₂O 25% p=0,044) (Figura 25B,C). Este resultado sugiere que en respuesta al estrés hiperosmótico, la rigidez de la membrana plasmática aumenta.

V. Las células B4G12 expresan RhoA y Rac1, dos reguladores maestros de la actomiosina

RhoA, Rac1 y Cdc42 son las tres principales Rho GTPasas que están involucradas en la remodelación del citoesqueleto regulando la actomiosina no

muscular. Además, al menos RhoA y Rac1 participan en la regulación de las proteínas ERM y de la miosina no muscular en diferentes tipos celulares (Kunda et al., 2008; Titushkin et al., 2013; Aranda et al., 2013). Esto nos llevó a postular la hipótesis de que el choque osmótico podría estar induciendo la activación de estas GTPasas, a través de las cuales se activarían la actomiosina y los conectores ERM durante la alteración de la barrera endotelial.

Dentro de la subfamilia de Rho existen tres proteínas, RhoA, RhoB y RhoC, que presentan una alta homología, y en estudios de sobreexpresión se ha demostrado que las tres participan en la formación de fibras de estrés (Ridley, 2001). A pesar de la alta homología, algunos efectores y reguladores actúan preferentemente sobre RhoA, RhoB o RhoC y estas tres proteínas tienen diferentes funciones en las células. (Wheeler and Ridley, 2004).

Para ver qué perfil de expresión de estas isoformas presenta la línea celular B4G12, se realizó un experimento comparativo utilizando como control a las células de endotelio vascular de cordón umbilical humano (HUVEC). Se sabe que en las células HUVEC al ser estimuladas con $\text{TNF}\alpha$ se expresan niveles comparables de RhoA, RhoB y RhoC (Marcos-Ramiro et al., 2016). Para nuestro experimento se comparó la diferente expresión de las tres isoformas en la línea celular B4G12 con extractos de HUVEC estimuladas con $\text{TNF}\alpha$ durante 8 h para tener niveles equitativos de RhoA, RhoB y RhoC (Figura 26). Los experimentos de western blot revelaron que la línea celular B4G12 expresa fundamentalmente RhoA y en menor cuantía RhoC. RhoB no fue detectada en el mismo extracto celular.

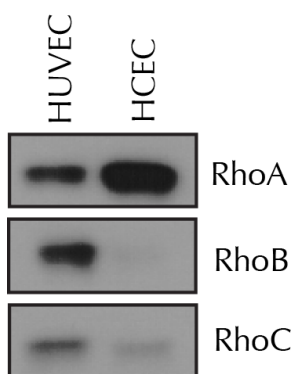


Figura 26: En la línea celular B4G12 se expresa mayoritariamente RhoA. Inmunodetección de las tres isoformas de Rho en la línea celular B4G12. Como control se utilizaron HUVEC estimuladas con $\text{TNF}\alpha$.

Para confirmar los datos obtenidos, se realizó una PCR cuantitativa comparando con la expresión de los transcritos de estas tres GTPasas con HUVEC. Además, decidimos estudiar también la expresión relativa de las tres GTPasas de la subfamilia Rac: Rac1, Rac2 y Rac3, frente a las que no teníamos anticuerpos para realizar estudios comparativos de expresión de proteína. Aunque hay GTPasas parecidas a Cdc42, se considera que sólo hay un miembro para Cdc42.

La PCR cuantitativa normalizada frente a tres RNA control (18S, GAPDH y beta-actina) claramente reveló que los transcritos para Rac2 y RhoB se expresan más en HUVEC que en las células B4G12 (Figura 27). Puesto que Rac1 y Rac2 se expresan a niveles altos en HUVEC y Rac3 apenas se expresa (Cain et al., 2010; Pai et al., 2010), estos resultados sugieren que Rac1 es la GTPasa de la subfamilia Rac que más se expresa en las células B4G12. Por otra parte, la PCR cuantitativa de los transcritos de los miembros de la subfamilia RhoA confirmaron que RhoB y RhoC se expresan menos en células B4G12 que en HUVEC, lo que indica de nuevo que RhoA es la GTPasa mayoritaria en las células B4G12. Finalmente, a diferencia de lo observado en HUVEC, TNF α no tuvo un efecto significativo en la expresión de los transcritos de ninguna de estas seis Rho GTPasas en las células B4G12 (Figura 27).

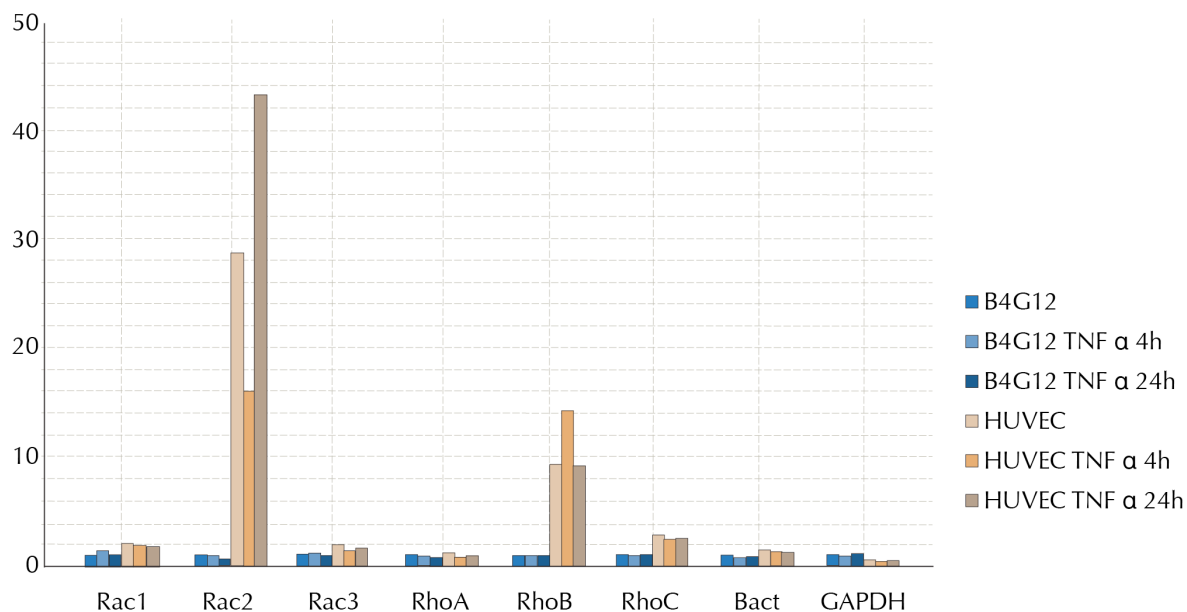


Figura 27: La línea celular B4G12 expresa mayoritariamente RhoA y Rac1. Representación gráfica de la PCR cuantitativa realizada para ver la expresión de las tres isoformas de Rho y Rac. Como control se utilizó un extracto de HUVEC. A ambos grupos se les estimuló con TNF α y se realizaron los extractos a las 4 y 24 h post estimulación. La PCR de cada gen está normalizada a los niveles de B4G12 sin estimular (HCEC).

VI. El choque hiperosmótico activa los reguladores maestros de actomiosina y proteínas ERM: las Rho GTPasas RhoA y Rac1

Para ver la activación de cada una de las Rho GTPasas implicadas en la remodelación, RhoA, Rac1 y Cdc42 frente a estímulos osmóticos, se realizaron ensayos de pull down con fragmentos de proteínas efectoras que se unen a las formas activas de estas GTPasas (ver Materiales y Métodos). Puesto que el principal efecto sobre la actina y la fosforilación de MLC y ERM lo habíamos observado induciendo hipertonicidad, nos centramos en este tipo de estrés. El estrés hiperosmótico inducido por un exceso de 150 mM NaCl produjo una activación de RhoA (3,51 NaCl 150 mM vs 1 HBSS $p=0,044$) (Figura28A,B) y Rac1 (2,12 para NaCl 150 mM vs 1 en HBSS $p=0,043$) (Figura 28A,C) y una leve activación de Cdc42 (1,25 para NaCl 150 mM vs 1 HBSS $p=0,23$) (Figura11A,D).

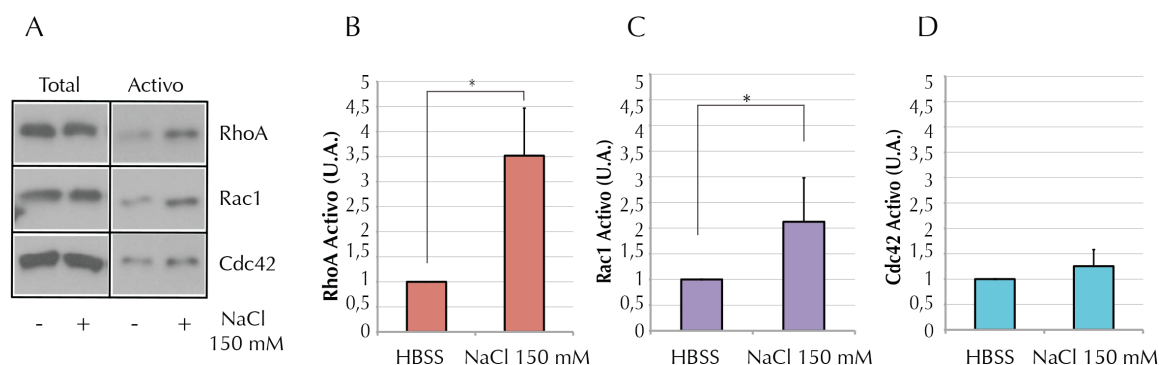


Figura 28: El choque hiperosmótico activa RhoA y Rac1 en la línea B4G12. A) Pull down para las formas activas de las tres Rho GTPasas. B-D) Cuantificación de la activación de RhoA (B) Rac1 (C) y Cdc42 (D) tras la adición de NaCl 150 mM al medio isotónico HBSS durante 10 minutos. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

Un choque hiperosmótico más moderado, mediante exposición a un exceso de sólo 50 mM de concentración salina, también indujo un incremento de la actividad de RhoA, siendo este incremento mayor a los dos minutos del estrés (1,44 NaCl 50 mM 2 min Vs 1 HBSS $p = 0,029$) y un incremento de la actividad de Rac1 a los 10 minutos (1,71 NaCl 50mM vs 1 HBSS $p = 0,029$) pero no de Cdc42 (Figura 29).

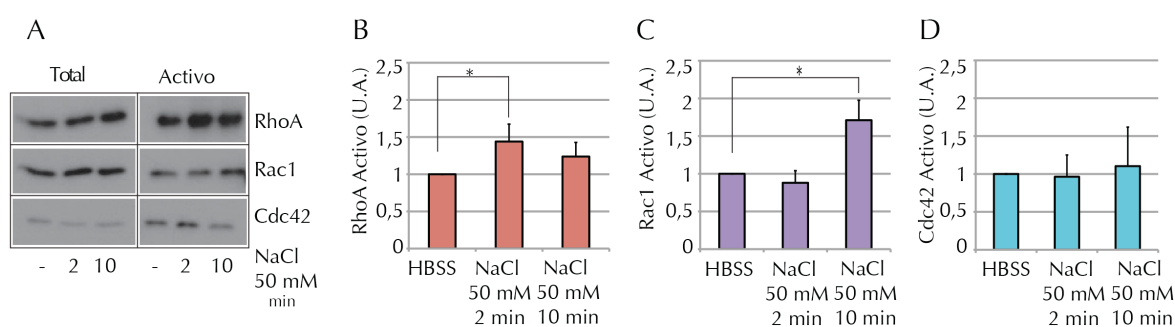
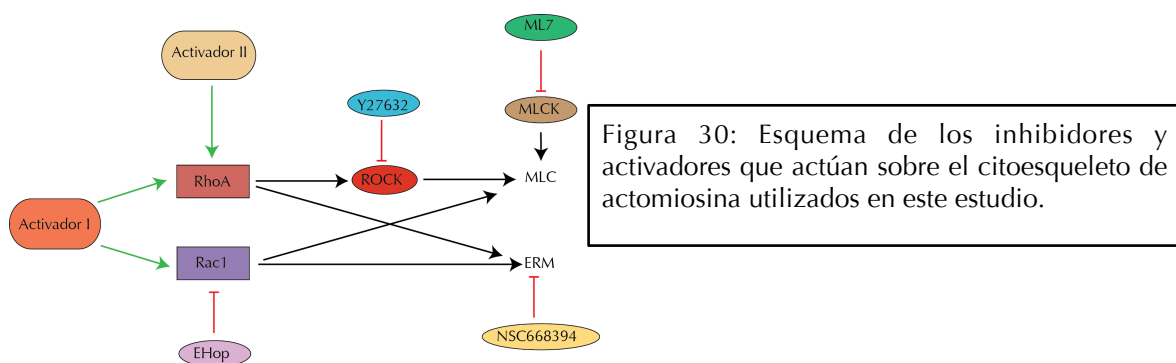


Figura 29: El choque hiperosmótico activa RhoA y Rac1 en la línea B4G12 A) Pull down para las formas activas de las tres Rho GTPasas. B-D) Activación de RhoA (B) Rac1 (C) y Cdc42 (D) tras la adición de NaCl 50 mM al medio isotónico HBSS durante 2 y 10 minutos. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

VII. El choque hiperosmótico aumenta la fosforilación de MLC, a través de una ruta de señalización controlada por RhoA, pero no por Rac1

A modo de esquema se presenta la Figura 30 para ilustrar el punto de acción de los inhibidores y activadores de la contracción de actomiosina utilizados en este estudio (Figura 30).



Una vez demostrado que el choque hiperosmótico produce una activación de RhoA y Rac1 que se traduce en contracción celular, se probaron diferentes inhibidores en el proceso de polimerización de actina para ver si se podía inhibir esa respuesta. El principal efector de RhoA, la quinasa ROCK (Ishizaki et al., 2000) se inhibe específicamente con el inhibidor Y27632 y regula la fosforilación de MLC. Como control positivo se ensayó con ML7, el inhibidor de MLCK, la principal quinasa responsable de la fosforilación de MLC (Bain et al., 2003). Se observó una disminución parcial de la fosforilación de MLC por Y27632 (2,08 para NaCl 150 mM vs 1,23 para NaCl 150 + Y27632; $p=0,02$) a niveles cercanos al de las células no expuestas al choque osmótico. Sorprendentemente, ML7 produjo resultados variables y cambios estadísticamente no significativos, sugiriendo que la fosforilación de MLC podría estar controlada por la fosfatasa MYPT o por otras quinasas en lugar de por MLCK (Patil and Bitar, 2006; Matsumura et al., 2001) (Figura 31A,B).

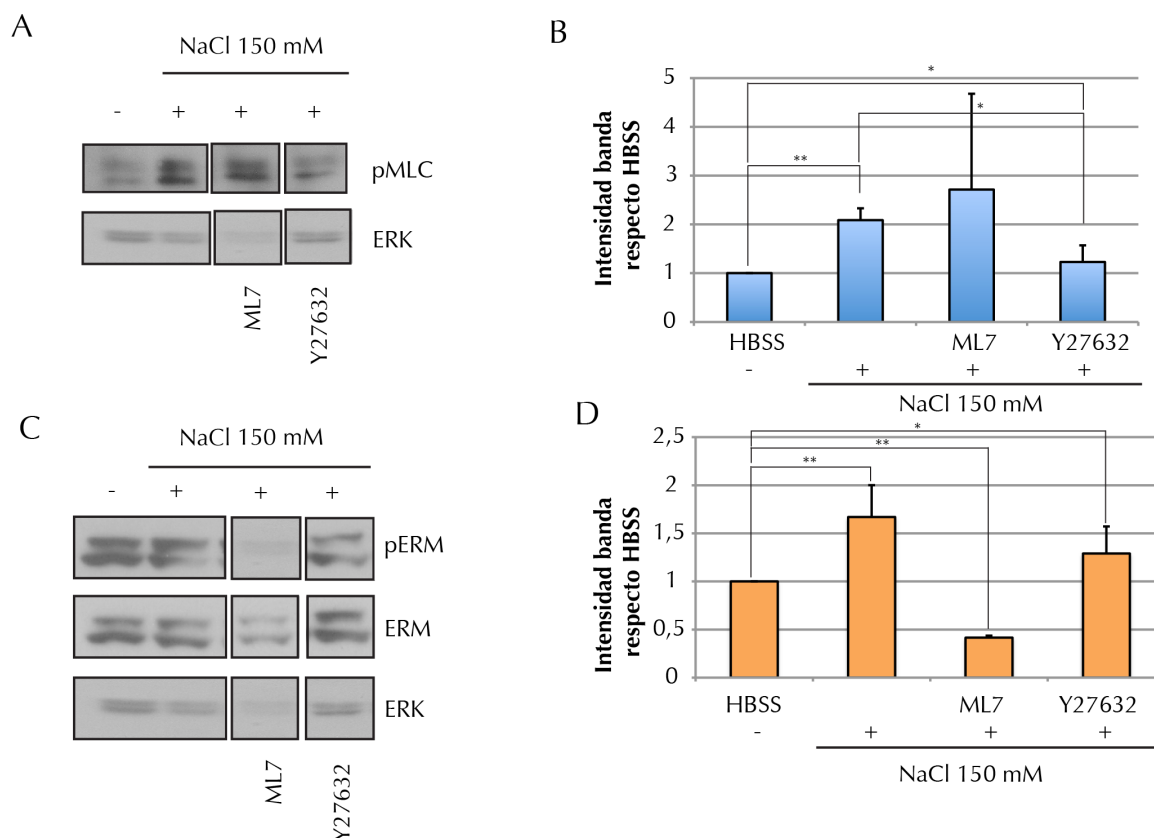


Figura 31: Y27632 inhibe parcialmente la fosforilación de MLC. A) Inmunodetección de pMLC tras el choque osmótico con NaCl 150mM durante 10 minutos en presencia de Y27632 5 μ M y ML7 10 μ M. B) Cuantificación de la fosforilación de MLC tras el choque osmótico con NaCl 150 mM durante 10 minutos en presencia de Y27632 5 μ M y ML7 10 μ M. C) Inmunodetección de pERM tras el choque osmótico con NaCl 150 mM durante 10 minutos en presencia de Y27632 5 μ M y ML7 10 μ M. D) Cuantificación de la fosforilación de ERM tras el choque osmótico con NaCl 150 mM durante 10 minutos en presencia de Y27632 5 μ M y ML7 10 μ M. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos *p<0.05; **p<0.005.

En cuanto a la activación de las proteínas ERM, se produjo un aumento de la fosforilación en respuesta a un exceso de NaCl 150 mM (1,67; $p=0,007$), como ya se había constatado en experimentos previos, que no fue significativamente reducido por Y27632 (Figura 31C,D). Por el contrario, ML7 produjo un descenso (0,41 vs 1,67 NaCl 150 mM $p=0,017$) de la fosforilación de ERM sugiriendo que bien esta MLCK podría controlar la fosforilación de las proteínas ERM o bien que la actomiosina es necesaria para mantener a las ERMs en su conformación activa.

En el choque hiperosmótico se produce una activación de Rac1, por lo que decidimos estudiar el efecto de la inhibición farmacológica de esta GTPasa. Se probó primero con el inhibidor de Rac1 NSC 23766 (Gao et al., 2004) y no se

observó una inhibición clara de Rac1 (Figura 32A) en la línea B4G12. A continuación, se ensayó con un nuevo inhibidor de Rac1 sintetizado recientemente y denominado E-HOP (Montalvo-Ortiz et al., 2012) que sí disminuyó la activación de Rac1 frente al choque osmótico y no de otras Rho GTPasas, como Cdc42 (Figura 32B). Esta inhibición de Rac1 no afectó de forma significativa la fosforilación de las proteínas ERM ni de MLC (Figura 32C, D, E).

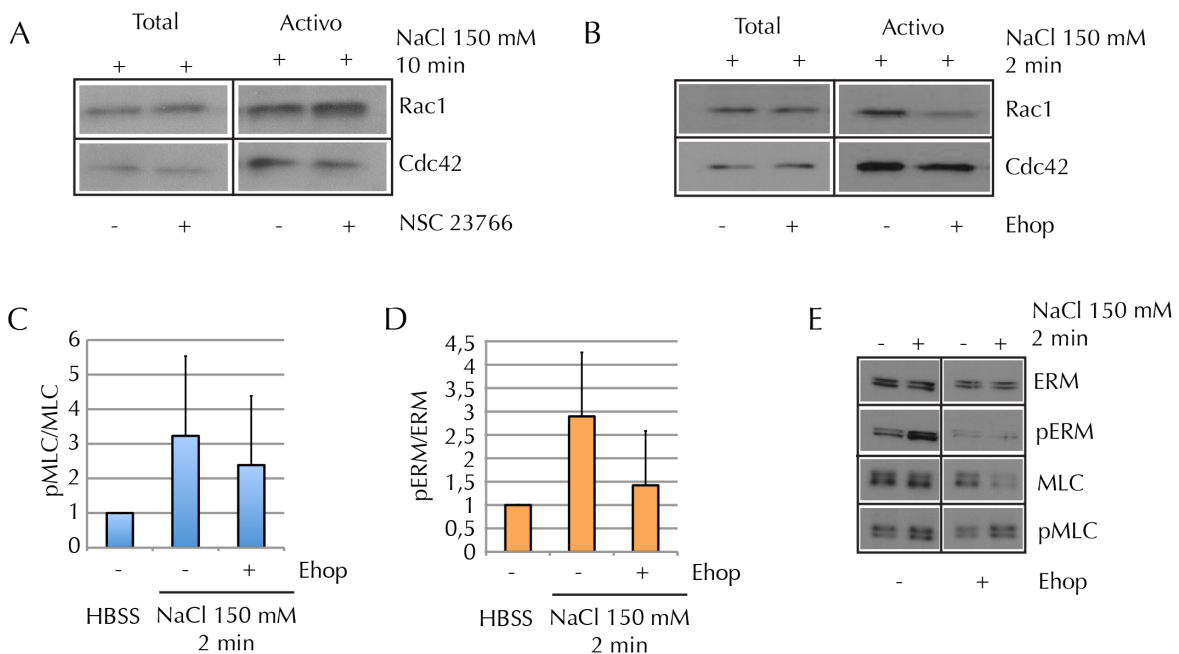


Figura 32: La inhibición de Rac1 tiene un efecto moderado sobre la fosforilación de ERMs y de MLC. A) Pull down para las formas activas de Rac1 y Cdc42 con el inhibidor de Rac1 NSC 23766 200 μ M. B) Pull down para las formas activas de Rac1 y Cdc42 con el inhibidor de Rac1 EHOP 1 μ M. C) Fosforilación de MLC tras la adición de NaCl 150 mM durante dos minutos en presencia de Ehop 1 μ M. D) Fosforilación de ERM tras la adición de NaCl 150 mM durante 2 minutos en presencia de Ehop 1 μ M. E) Inmunodetección de la fosforilación de ERM y MLC en presencia de Ehop. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

Nuestros resultados demuestran por tanto que el choque hiperosmótico produce una activación de las GTPasas RhoA y Rac1, pero no de Cdc42. La GTPasa RhoA, a través de su efector ROCK, media el aumento de fosforilación de MLC, que controla la contracción mediada por actomiosina. ROCK, sin embargo, no regula la activación que el estrés hiperosmótico produce en las proteínas ERMs, implicadas en la asociación entre la membrana y el citoesqueleto de actina y que controlan la rigidez celular. Por último, los estudios con E-HOP indican que Rac1 no es el regulador principal de la activación de miosina, y de las proteínas ERMs.

Basándonos en estos resultados decidimos investigar si inhibidores farmacológicos disponibles frente a este conjunto de proteínas activadas en respuesta al estrés hiperosmótico, pudieran reducir la pérdida de función de barrera endotelial en respuesta a dicho estrés (Figura 30).

VIII. La inhibición de la miosina no muscular y de los microtúbulos disminuye la función barrera de forma constitutiva.

Nos centramos en el primer componente celular cuya activación observamos, el citoesqueleto de actomiosina ya que su regulación es crítica para el mantenimiento y la regulación de la función barrera de la monocapa endotelial (Waschke, 2004; Lee and Gotlieb, 2003). En el endotelio de córnea en particular se han realizado algunos estudios midiendo la resistencia eléctrica transmembrana en el endotelio corneal y se ha observado una regulación de la función barrera a través de interacciones del citoesqueleto de actomiosina con los complejos de unión (Srinivas, 2010). El citoesqueleto de actina, además, está estrechamente relacionado con otras redes citoesqueléticas, como los microtúbulos o los filamentos intermedios (Bezanilla et al., 2015).

En una primera ronda de experimentos, se testaron inhibidores de la miosina no muscular tipo II. ML7 inhibe MLCK y la fosforilación de MLC (Bain et al., 2003). Sin embargo, puesto que su efecto no parecía muy claro en las células endoteliales de córnea, testamos también el efecto de la blebbistatina, un inhibidor directo de la miosina II no muscular, que bloquea la cabeza de esta proteína manteniéndola en un estado de baja afinidad por la actina (Helwani et al., 2004). Tras la incubación con ML7 y blebbistatina y sin exposición a estrés osmótico, se observó una disminución de la resistencia eléctrica transmembrana (pérdida de 15% en ML7, 28% en blebbistatina) y un aumento de la permeabilidad con los inhibidores (Figura 33).

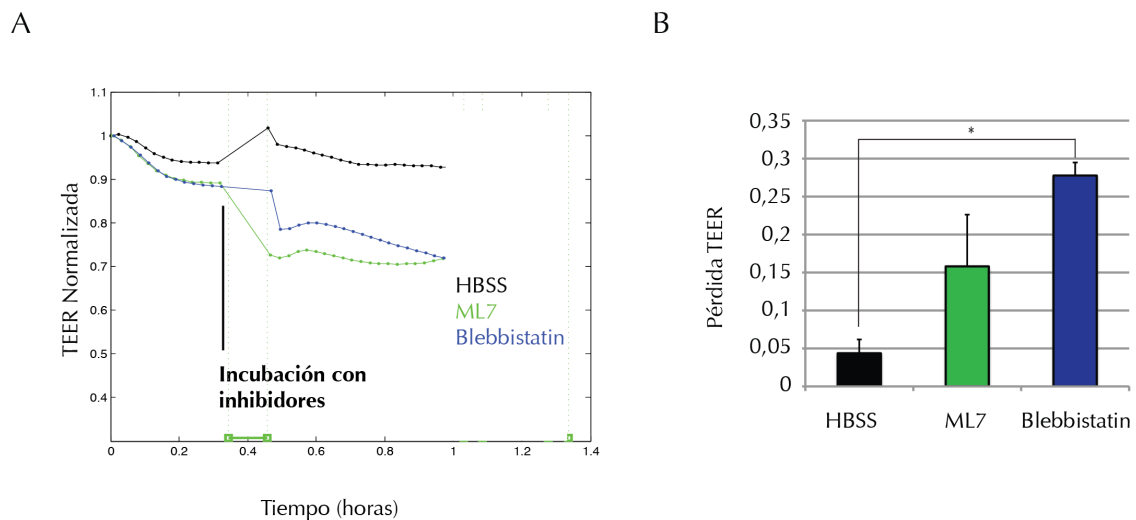


Figura 33: La inhibición de la miosina no muscular causa una disminución de la resistencia transmembrana basal. A) Representación de la resistencia transepitelial en la línea B4G12 tras la adición de ML7 10 μ M y blebbistatina 50 μ M durante 30 minutos. B) Cuantificación de la pérdida de la resistencia transepitelial en la línea B4G12 tras la adición de ML7 10 μ M y blebbistatina 50 μ M. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

Por tanto, parece que la miosina no muscular no es la mejor diana para prevenir la alteración de la barrera endotelial en respuesta a estrés ya que, a pesar de que se activa en respuesta a este estímulo, el efecto de su inhibición sugiere que es un complejo de proteínas esencial para el mantenimiento de la integridad de la barrera endotelial.

A continuación, cambiamos de estrategia y decidimos testar el efecto de inhibidores que inciden sobre la ruta de señalización que regula la actomiosina, y que también afectan a otra red citoesquelética, los microtúbulos. Las proteínas Rho se activan a través de GEFs. Algunas de estas GEFs, como GEF-H1, son secuestradas por el citoesqueleto de microtúbulos, de modo que la despolimerización de este con nocodazol causa una activación significativa de RhoA (Chang et al., 2008) mientras su estabilización con taxol la reduce (Jalimarada et al., 2009).

Para estudiar el efecto de la alteración de los microtúbulos sobre la permeabilidad de la monocapa, se realizaron experimentos de medición de la resistencia transmembrana con el ECIS. Se incubó la línea celular con dos compuestos: nocodazol, inhibidor de la polimerización de microtúbulos (De

Brabander et al., 1977) y taxol, un estabilizador de microtúbulos (Schiff et al., 1979) (Figura 34). Tras la incubación con nocodazol y taxol y sin exposición a estrés osmótico, se observó una disminución de la resistencia eléctrica transmembrana en el caso del nocodazol (pérdida del 24%), consistente con el aumento descrito de la contractilidad y la actividad de RhoA en otros tipos celulares (Chang et al., 2008). Sin embargo, la estabilización con taxol no disminuyó la contracción en respuesta al choque hiperosmótico (Figura 34B).

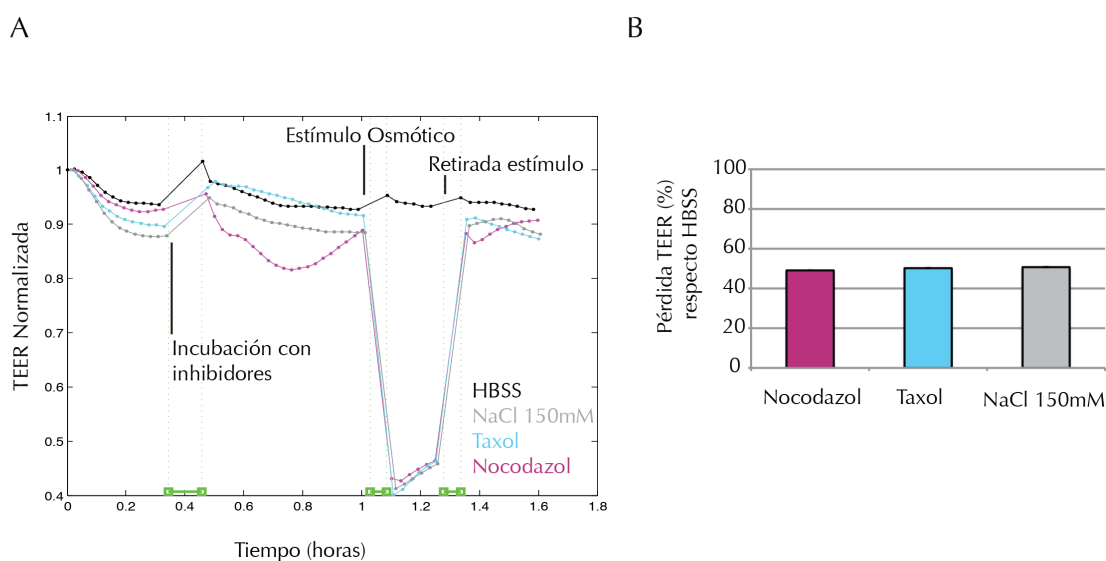


Figura 34: La inhibición de los microtúbulos o su estabilización no afecta a la contracción por choque osmótico. A) Resistencia transendotelial (TEER) en la línea B4G12 tras el choque osmótico con 150 mM NaCl durante 10 minutos en presencia de nocodazol 0,2 μ M y taxol 10 μ M. B) Cuantificación de la pérdida relativa de TEER en la línea B4G12 tras la exposición a 150 mM NaCl durante 10 minutos en presencia de nocodazol 0,2 μ M y taxol 10 μ M.

IX. Expresión de proteínas ERM en la línea celular B4G12 y efecto del inhibidor de ezrina NSC 668394

Después, decidimos centrarnos en inhibidores farmacológicos de las proteínas ERM, que también se activan durante la contracción inducida por choque osmótico. Como se ha mencionado, las proteínas ERM regulan la estructura y función de diferentes dominios en el córtex celular. Estas proteínas parecen actuar tanto *downstream* como *upstream* de las Rho GTPasas que modulan la reorganización del citoesqueleto de actomiosina (Ivetic and Ridley, 2004; Fehon et al., 2010).

Las proteínas ERM son ubicuas, pero difieren en sus proporciones relativas según el tipo celular. Recientemente, se ha generado un inhibidor específico para una de estas proteínas, la ezrina, denominado NSC 668394, pero con menor especificidad para moesina y radixina (Bulut et al., 2011). Para dilucidar mejor la expresión de cada una de estas proteínas y su contribución a la función de barrera de las células B4G12, se realizó un perfil de expresión de estas proteínas en nuestra línea celular. Para ello, se comparó la expresión de ezrina, moesina y radixina en las células B4G12 con la de otros tipos celulares cuya abundancia relativa de cada una de estas tres proteínas es conocida como HUVEC y HEPG2 (Figura 35).

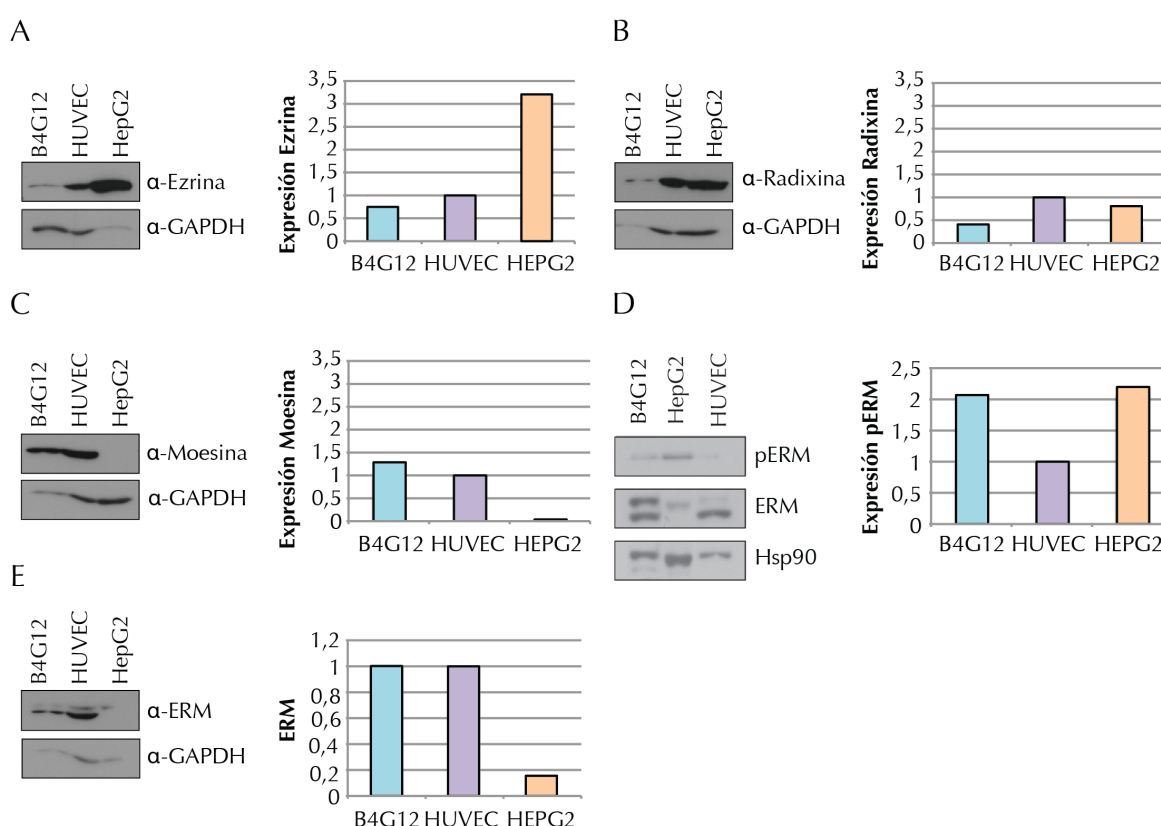


Figura 35: La línea células B4G12 expresa mayoritariamente moesina. Inmunodetección de ezrina A) radixina B) moesina C) ERM fosforilada (pERM) D) y ERM E) Las cuantificaciones están normalizadas frente a los niveles de expresión en HUVEC.

En células endoteliales de cordón umbilical humano se expresan mayoritariamente moesina y ezrina (Barreiro et al., 2002), mientras que en las células HEPG2 de origen hepático se expresan fundamentalmente ezrina y radixina, al ser células derivadas de un hepatoma (Okamura et al., 2008). Para hacer la cuantificación, se

normalizó respecto a la expresión de estas proteínas en células de endotelio humano de cordón umbilical, HUVECs. Los resultados mostraron que la línea celular B4G12 expresa las tres proteínas ERM, aunque de forma mayoritaria moesina, mientras que ezrina y radixina son expresadas en menor cuantía. En comparación con las células HUVECs, la línea celular B4G12 tiene más proteínas ERM activas (pERM) en ausencia de estrés.

X. El inhibidor de ezrina NSC668394 no tiene efecto sobre la pérdida de resistencia

A continuación, se realizaron estudios de resistencia eléctrica transendotelial en la línea celular B4G12 en presencia del inhibidor de ezrina NSC 668394. Este inhibidor impide de manera reversible la fosforilación en T567 y fue bien tolerado por la línea celular, pero no se evidenció un efecto protector de la integridad de la monocapa, produciéndose una pérdida de resistencia equivalente a las condiciones controles, tanto en exposiciones largas a estrés hiperosmótico intenso (Figura 36A) como en exposiciones cortas con estrés hiperosmótico menor (Figura 36B).

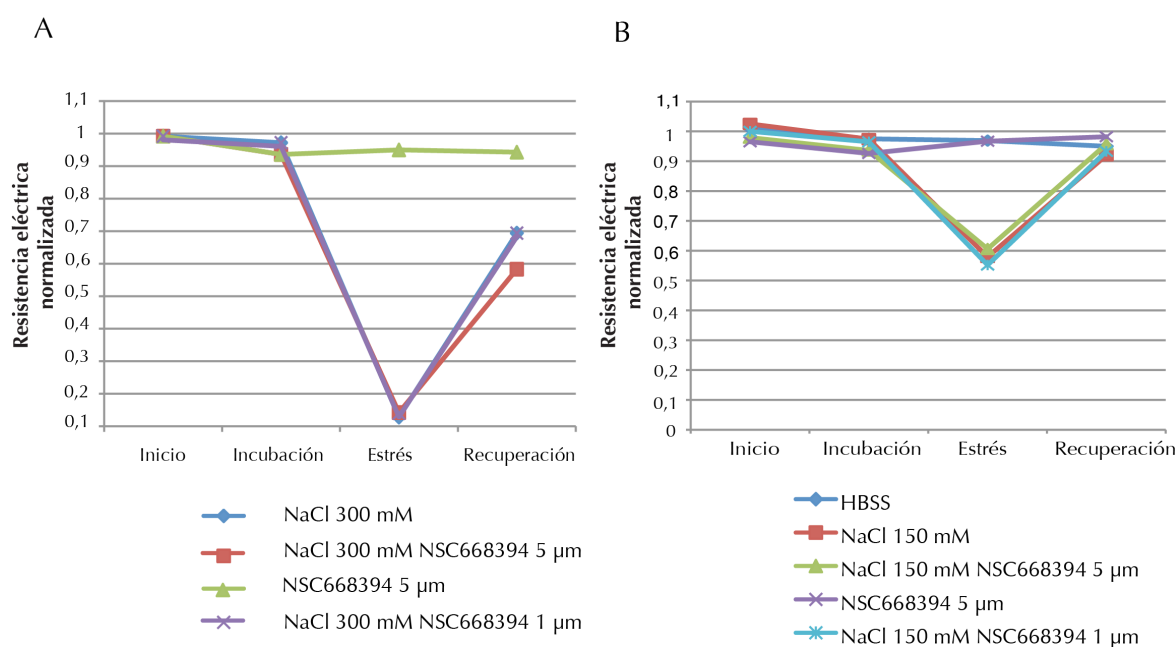


Figura 36: El inhibidor NSC668394 no produce efecto sobre la pérdida de resistencia. A) Representación de la resistencia transepitelial en la línea B4G12 tras la adición de NaCl 300 mM durante 120 min. en presencia del inhibidor NSC668394. B) Representación de la resistencia transepitelial en la línea B4G12 tras la adición de NaCl 150 mM durante 10 min. en presencia del inhibidor NSC668394.

Además, su efecto sobre la fosforilación de las proteínas ERM no fue significativo, indicando que la inhibición de la ezrina no es suficiente para reducir la fosforilación total de la familia ERM en las células B4G12 (Figura 37). Esto ocurre probablemente porque moesina y no ezrina es la ERM mayoritaria en las células B4G12. Por tanto, este inhibidor no tiene efecto sobre la función de barrera y la activación de las proteínas ERMs en respuesta al estrés hipertónico.

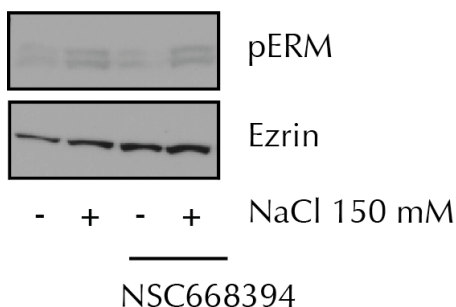


Figura 37: El inhibidor NSC668394 no produce efecto sobre la fosforilación de ERM. Inmunodetección de pERM en la línea B4G12 tras el choque osmótico con NaCl 150 mM durante 5 minutos en presencia del inhibidor NSC668394 5 μ M.

XI. La inhibición de la ruta de señalización controlada por RhoA atenúa muy ligeramente la bajada de resistencia

Tras los resultados negativos intentando prevenir la disfunción de barrera endotelial de córnea mediante la inhibición farmacológica de la actomiosina, la activación de MLC y de ERM, nos centramos en las GTPasas que son activadas durante el choque osmótico.

Siguiendo nuestra hipótesis de que RhoA y/o Rac1 activos podrían estar regulando la pérdida de función de barrera en respuesta al choque osmótico, a continuación se ensayó el efecto del inhibidor de ROCK Y27632, la quinasa efectora de RhoA, y con el inhibidor de Rac1, EHop. Con concentraciones altas de estrés osmótico (NaCl 300mM) y a tiempos largos (120 minutos) no se observó ningún efecto atenuador con Y27632 ni con EHop (Figura38).

Tanto la pérdida inicial de resistencia como la recuperación posterior al retirar el estrés osmótico no se vieron afectadas tras la adición de los inhibidores. Pérdida de resistencia tras el estrés osmótico fue de 86,8% para un exceso de NaCl 300 mM, 85,6% para NaCl 300 mM + Ehop 1 μ M y 85,9% para NaCl 300 mM + Y27632 5 μ M (Figura 38A,B).

Con concentraciones de 150 mM de estrés se observó una atenuación parcial y muy moderada de la bajada de resistencia y una recuperación más lenta. La

atenuación de la bajada de resistencia fue estadísticamente significativa para Y27632 ($p=0,003$) (Figura 38C,B) pero menor. También se observó que tanto Y27632 como E-Hop retrasaron la reformación de la capa endotelial. Este retraso sugiere que la activación que observamos para RhoA y Rac1 durante el choque osmótico podría ser una respuesta de reparación de la barrera endotelial, no una ruta de señalización implicada en su destrucción.

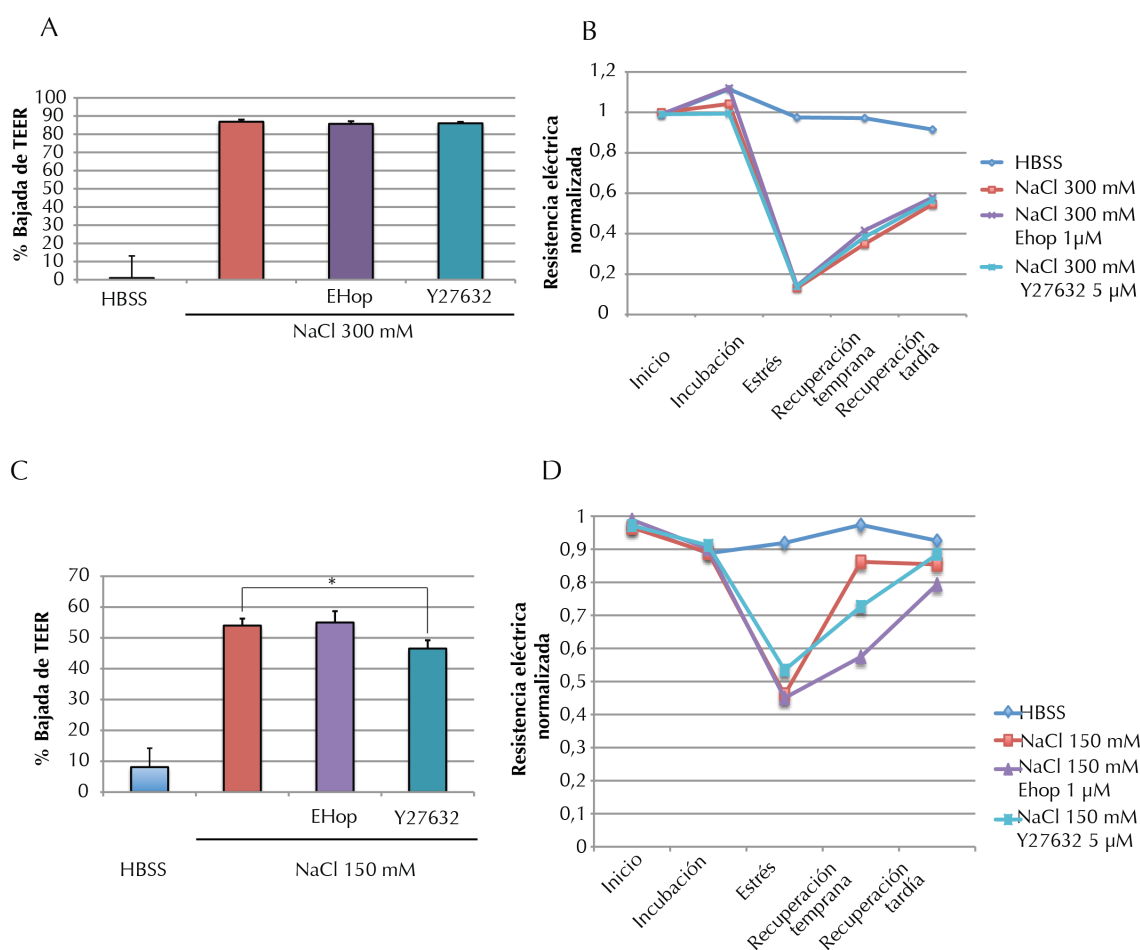


Figura 38: La inhibición de la ruta de señalización controlada por RhoA en el choque hiperosmótico a concentraciones altas no produce efecto. A) Cuantificación de la pérdida de la resistencia transepitelial tras la adición de NaCl 300 mM durante 120 min. en presencia de EHop 1 μ M y de Y27632 5 μ M. B) Representación de la resistencia transepitelial en la línea B4G12 tras la adición de NaCl 300mM durante 120 min. en presencia de EHop 1 μ M y Y27632 5 μ M. Recuperación temprana medida 10 minutos tras retirar el medio y sustituirlo por HBSS y recuperación tardía a los 90 minutos C) Cuantificación de la pérdida de la resistencia transepitelial tras la adición de NaCl 150 mM durante 10 min. en presencia de EHop 1 μ M y de Y27632 5 μ M. D) Representación de la resistencia transepitelial en la línea B4G12 tras la adición de NaCl 150 mM durante 10 min. en presencia de EHop 1 μ M y Y27632 5 μ M. Recuperación temprana medida 10 minutos tras retirar el medio y sustituirlo por HBSS, y recuperación tardía a los 60 minutos. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos * $p<0.05$; ** $p<0.005$.

Para caracterizar mejor la atenuación parcial de la pérdida de resistencia, se realizaron experimentos con el menor exceso de NaCl con el que todavía se activa la vía de RhoA y Rac1 (Figura 29). El efecto atenuador sobre la pérdida de resistencia con Y-27632 fue de nuevo muy moderado y mayor a concentraciones bajas de NaCl, 25mM y 50mM (Figura 21). Sin embargo, se observó claramente una recuperación más lenta de la resistencia tras la retirada del estrés osmótico, sugiriendo que este inhibidor tiene un efecto sobre la reformación de monocapa celular (Figura 39).

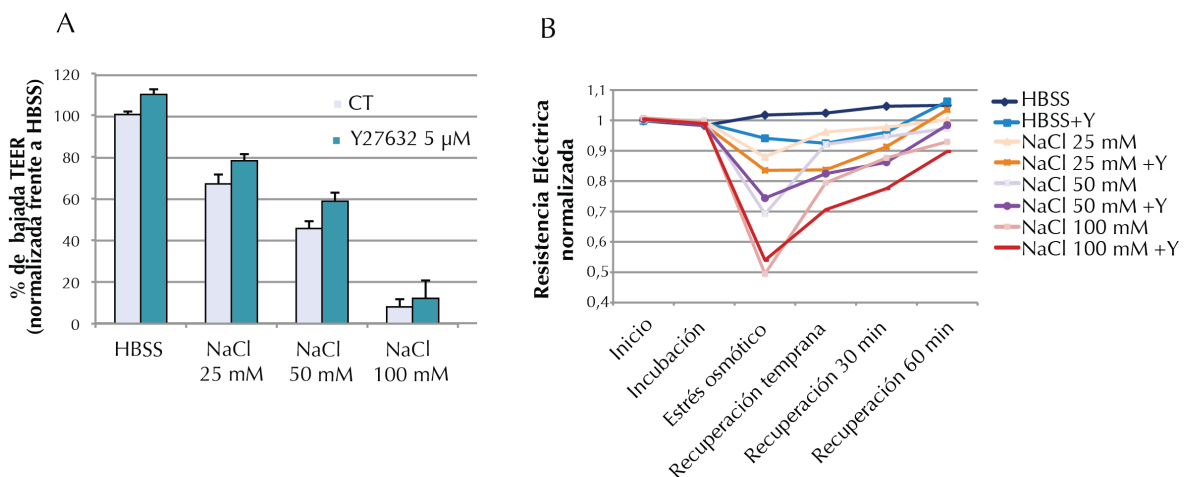


Figura 39: La inhibición de la ruta de señalización controlada por RhoA atenúa muy ligeramente la bajada de resistencia y retrasa la reformación. A) Cuantificación de la pérdida de la resistencia transepitelial tras la adición de NaCl 25 mM, 50 mM y 100 mM durante 10 min. en presencia de Y27632 5 μ M. B) Representación de la resistencia transepitelial y posterior recuperación en la línea B4G12 tras la adición de NaCl 25 mM 50 mM y 100 mM durante 10 min. en presencia de Y27632 5 μ M. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

Esto podrían indicar que la vía de señalización de Rho A podría estar implicada en la homeostasis de la función barrera, participando esta vía tanto en la desestructuración inicial de las uniones intercelulares frente al estímulo como en la reformación de las mismas tras la retirada del estímulo.

Sin embargo, la inhibición de Rac1 con Ehop frente a estrés osmótico muy moderado no produjo ningún efecto sobre la contracción inicial ni sobre la recuperación posterior (Figura 40).

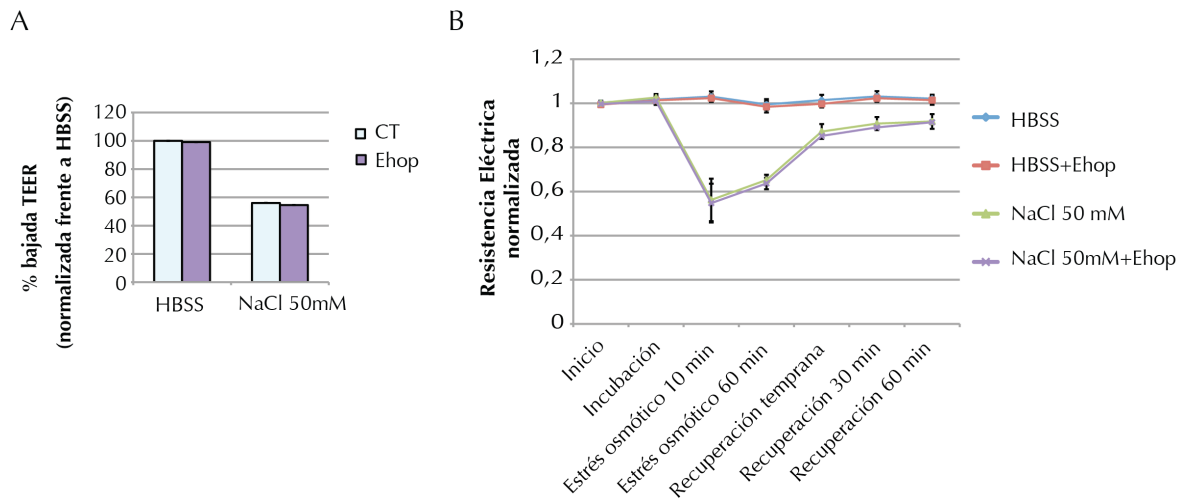


Figura 40: La inhibición de la ruta de señalización controlada por Rac1 no afecta ni a la contracción ni a la posterior recuperación. A) Cuantificación de la pérdida de la resistencia transepitelial tras la adición de NaCl 50 mM 10 min. en presencia de Ehop 1 μ M. B) Representación de la resistencia transepitelial y posterior recuperación en la línea B4G12 tras la adición de NaCl 50 mM durante 10 min. en presencia de Ehop 1 μ M. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

A continuación, quisimos investigar si el estrés osmótico prolongado daña de forma permanente la monocapa endotelial. Para ello se expuso la monocapa a estrés hiperosmótico añadiendo NaCl 150 mM y 300 mM durante un tiempo mas prolongado, de 120 minutos. Tras la retirada del estímulo la resistencia eléctrica transmembrana medida por el ECIS alcanza una meseta inferior a la resistencia inicial. Esta estabilización de la resistencia a un nivel inferior a la resistencia inicial (Figura 41A) se considera criterio de muerte celular.

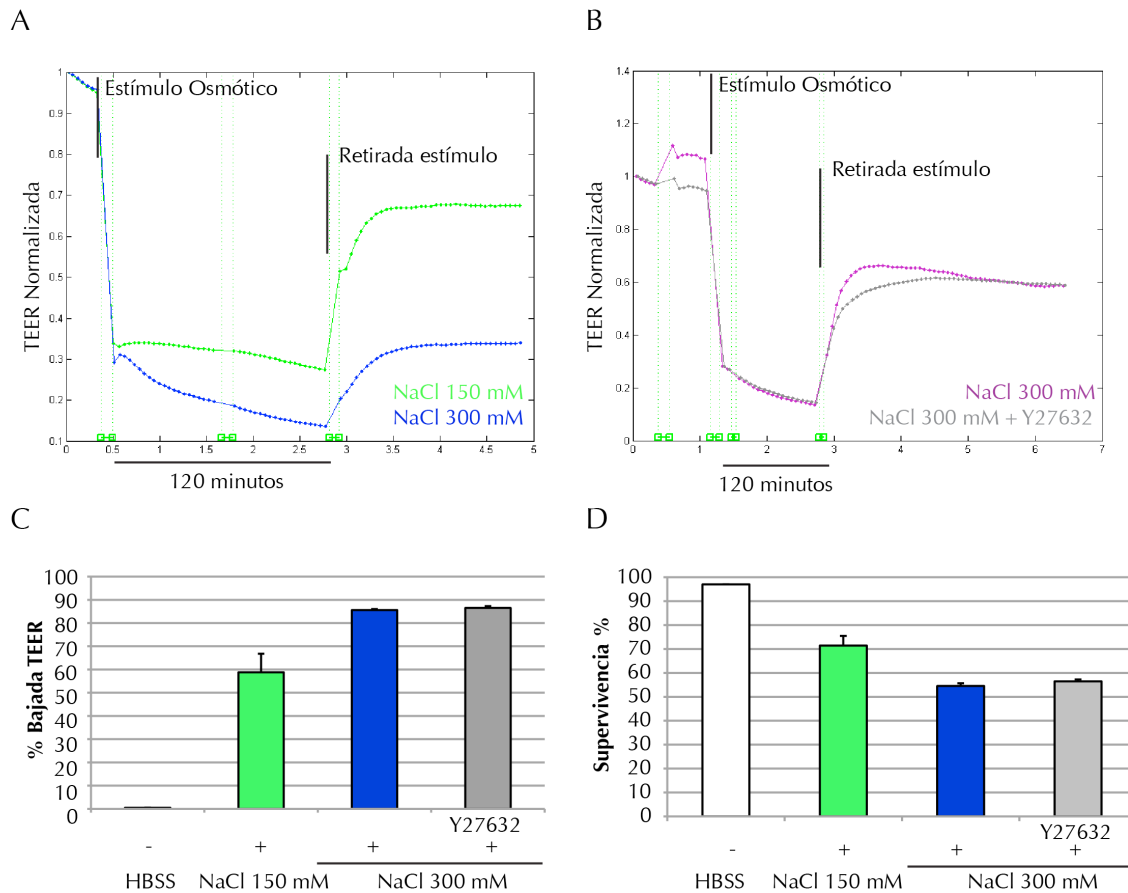


Figura 41: El estrés osmótico prolongado daña de forma permanente la monocapa endotelial. A) Representación de la resistencia transepitelial en la línea B4G12 tras la adición de NaCl 300mM y 150mM durante 120 min. B) Representación de la resistencia transepitelial en la línea B4G12 tras la adición de NaCl 300mM durante 120 min. en presencia de Y27632 5 μ M. C) Cuantificación de la pérdida de resistencia transepitelial tras la adición de NaCl 150 mM 300 mM en presencia de Y27632 5 μ M. D) Supervivencia de la línea celular cuantificada tras dos horas de recuperación tras la exposición durante 120 min. a NaCl 150 mM 300 mM en presencia de Y27632 5 μ M.

La adición de Y-27632 5 μ M al medio no atenuó la contracción inicial (Figura 41B,C) (58,8% en NaCl 150 mM 120 min; 85,6% en NaCl 300 mM 120 min y 86,1% para NaCl 300 mM + Y27632 5 μ M) y tampoco protegió frente al daño celular causado por el estrés, siendo la resistencia tras la recuperación similar a la de estrés osmótico (Figura 41D) (pérdida de 46% en NaCl 300 mM y 44% en NaCl 300 mM + Y 27632 5 μ M frente a HBSS).

XII. La vía de señalización Rho/ROCK está implicada en la homeostasis de la función barrera

En respuesta a un exceso de NaCl, se produce un estrés al que las células responden mediante la activación de RhoA, Rac1, ERM y MLC. La primera hipótesis formulada, que la pérdida de función de barrera endotelial está mediada por estas proteínas señalizadoras, no parece confirmada por los resultados, puesto que la inhibición de las rutas de RhoA y Rac1 tienen un efecto muy moderado o no tienen efecto sobre la contracción. Más aún, en el caso de Y-27632 y E-Hop, los inhibidores del efector de RhoA, ROCK, y de Rac1 respectivamente, este parece retrasar la recuperación de la monocapa en algunas condiciones de estrés. De acuerdo con este resultado, formulamos una segunda hipótesis, en la que decidimos investigar si la señalización que estábamos observando constituía en realidad una respuesta al estrés que las células activan para intentar recuperar su estado inicial; es decir, si estábamos detectando una respuesta homeostática.

Siguiendo la hipótesis de que la vía de señalización a través de la activación de Rho podría estar implicada en la recuperación de la función barrera, en lugar de mediar su disfunción, se decidió probar el efecto de un activador de la familia de Rho que activa Rho, Rac y Cdc42 derivado de la exotoxina Factor necrotizante citotóxico (CNF) de *Escherichia coli* (Rho/Rac/Cdc42 Activator I) (Aepfelbacher and Essler, 2001) y con un activador que activa únicamente Rho frente al estrés osmótico (Rho Activator II) derivado también de la misma toxina. Los ensayos de pull down sugirieron que, el activador I estimula preferentemente Rac y Cdc42, mientras que el activador II claramente incrementó la carga GTP de RhoA, pero no de Rac1 y Cdc42, que disminuyó (Figura 42).

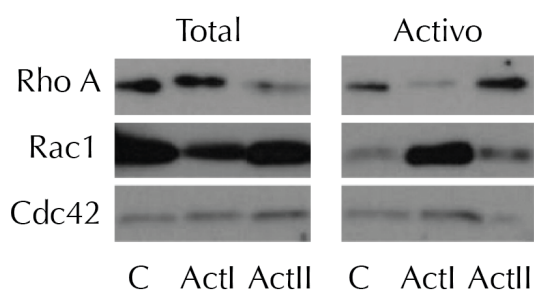


Figura 42: El activador I activa principalmente a Rac1 y el activador II, a RhoA. Pull down de las formas activas de las tres Rho GTPasas, RhoA, Rac1 y Cdc42, en presencia de activador I 1gr/ml y de activador II 5 g/ml y en condiciones control.

A continuación probamos el efecto de estos activadores sobre la TEER de B4G12 en el sistema ECIS. En ausencia de estrés, la incubación con el activador I o el activador II produjo, un aumento de la resistencia en ambos casos, siendo mayor con el activador II (Figura 43).

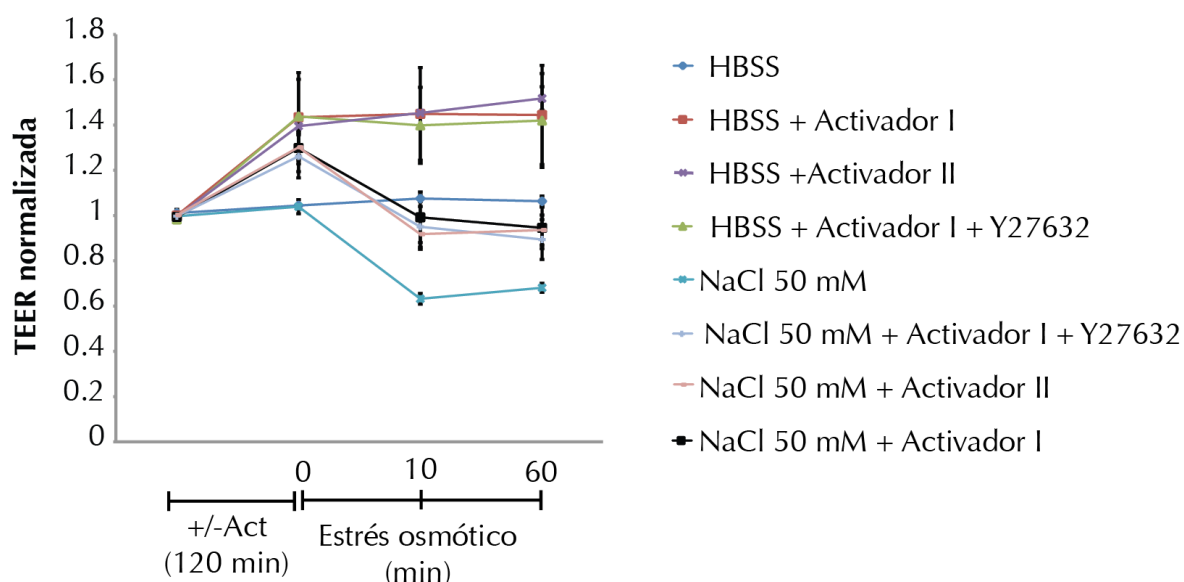


Figura 43: RhoA y Rac1 contribuyen al mantenimiento de la función barrera. Representación gráfica de la contracción que sigue al estrés osmótico en una monocapa endotelial B4G12, tras la exposición a estrés osmótico 50 mM con la presencia de activador I 1 g/ml, de activador II 5 g/ml y de Y27632 5 μ M.

Además en la exposición a estrés osmótico, las células preincubadas con los activadores sufrieron una menor caída de la resistencia estadísticamente significativa en todos los casos, siendo el efecto mayor en el caso del activador I. Este resultado indicaría una contribución tanto de la activación de Rac1 como de RhoA en el mantenimiento de la función barrera. El efecto preferente del activador I sobre Rac1 y Cdc42 pero no sobre RhoA lo confirmamos mediante la combinación del activador I con el inhibidor de la ruta señalizadora mediada por RhoA, Y-27632. La presencia de este inhibidor no atenuó el efecto sobre la acción del activador, más bien la incrementó, indicando que éste no actúa preferentemente a través de la vía señalizadora controlada por RhoA (Figura 43).

Para estudiar específicamente el efecto que la activación de estas GTPasas, tienen en la recuperación de la barrera endotelial tras el estrés osmótico, se añadieron los activadores a la monocapa tras un choque osmótico de mayor intensidad y más prolongado que el realizado en los experimentos anteriores, para observar mejor el proceso de recuperación de la TEER (Figura 44).

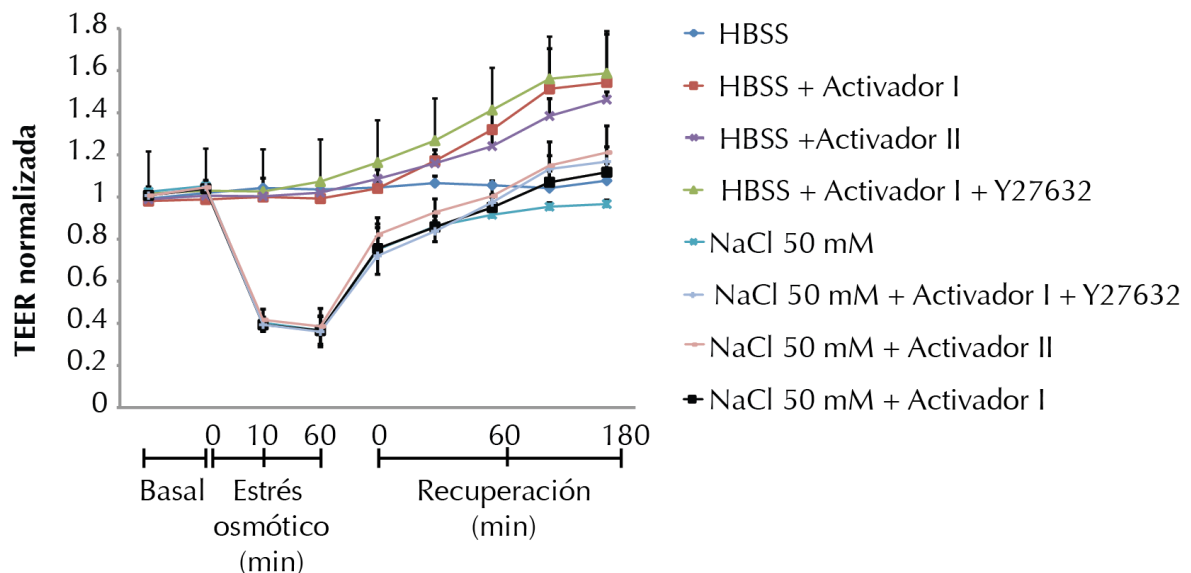


Figura 44: Efecto del tratamiento con activadores de las Rho GTPasas en la recuperación tras choque hiperosmolar. Representación gráfica de recuperación a lo largo de 180 min. tras la contracción producida por el estrés osmótico en una monocapa endotelial de células B4G12 tras la exposición a estrés osmótico 150 mM durante 60 minutos, con la presencia de activador I 1 g/ml, de activador II 5 g/ml y de Y27632 5 μ M. Las barras de error muestran el promedio + SEM de al menos tres experimentos distintos

Ambos activadores produjeron una mejor recuperación de la función barrera y más rápida que en condiciones control. La recuperación fue más rápida y mayor en el caso del activador II.

Como conclusión, la respuesta del endotelio corneal al estrés hiperosmótico no sólo no se previene por la inhibición de RhoA y Rac1, sino que es necesaria la activación del eje Rho-ROCK-MLC y de Rac1 para mantener la función barrera. Los resultados de los experimentos con inhibidores y activadores sugieren que la activación de dichas vías podría formar parte de una respuesta celular para mantener la homeostasis. Por ello, proponemos que la activación del eje RhoA-ROCK y de Rac1 podría ser una diana terapéutica para preservar la integridad del endotelio corneal frente a diferentes tipos de estrés

3. Desarrollo del modelo animal Ex Vivo

El uso de modelos animales para el estudio de enfermedades juega un papel básico en su entendimiento. El disponer de un modelo *ex vivo* nos permite el estudio de los mecanismos de respuesta al estrés osmótico en un tejido animal. La elección de ratón se debió a la fácil disponibilidad de tejido por ser un modelo animal habitual en investigación y a la existencia de posibilidades de desarrollar estrategias genéticas *in vivo* en un futuro para estudiar la función de proteínas relevantes en la función de barrera endotelial.

Como última parte de este trabajo, se puso a punto la extracción de las córnea murinas y el tallado y posterior manejo y tinción del endotelio corneal murino (Figura 45). Tras la extracción y cultivo en Tissue C, la fijación y posterior tinción con faloidina fluorescente nos permitió distinguir las diferentes capas celulares de la cornea (ver Materiales y métodos).

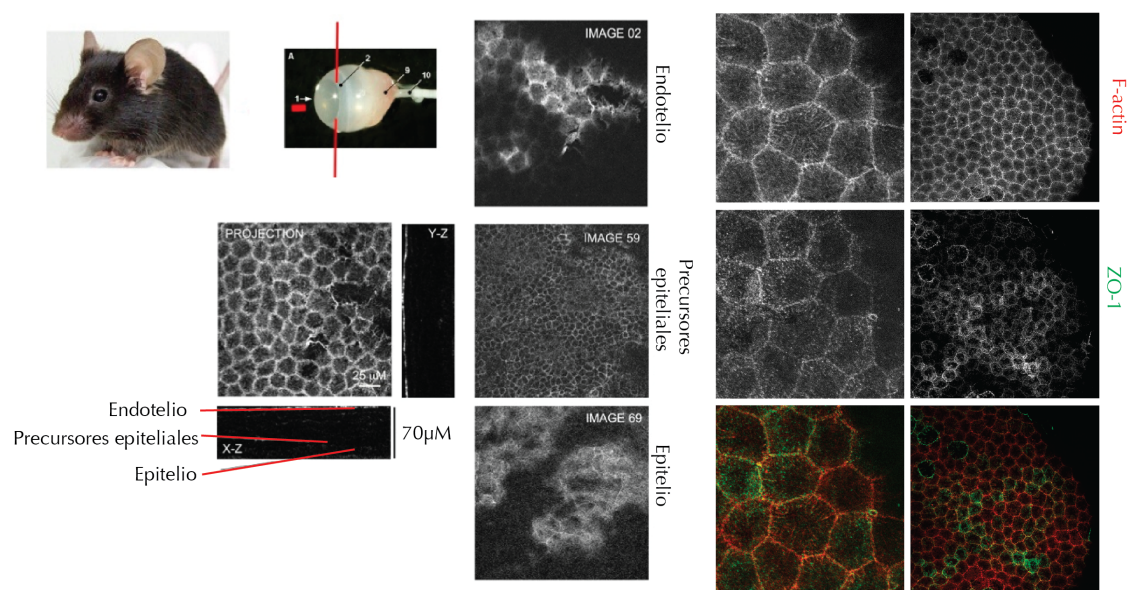


Figura 45: Modelo experimental murino. Imágenes de microscopia confocal en los que se muestran las distintas capas de la córnea. Tinción con F-actina en rojo y con ZO-1, en verde.

Como validación del modelo murino se comparó la morfología de una córnea central humana, una córnea murina y la línea celular B4G12. Los resultados se muestran en la Figura 46.

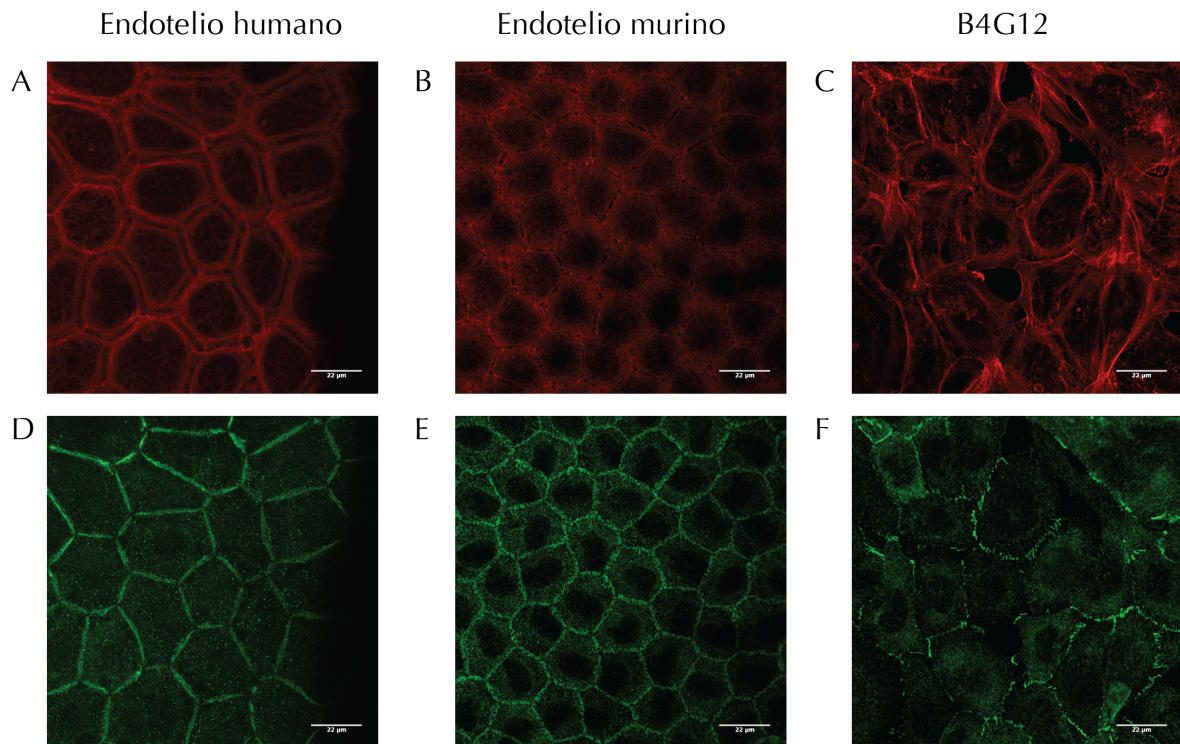


Figura 46: Comparación morfológica de los endotelios primario humano, del murino y de la línea celular B4G12. Fila superior tinción para F-actina en los endotelios humano (A), murino (B) y en la línea endotelial B4G12 (C) En la fila superior, tinción con ZO-1 en el endotelio humano (D), murino (E) y en la línea B4G12 (F).

Se realizaron ensayos de estrés hiperosmótico en las córneas murinas *ex vivo* y se compararon con los experimentos realizados previamente en lentículos humanos. En ambos casos se observó una desestructuración de las uniones intercelulares demostrada por una disminución de la intensidad de ZO-1 junto con una contracción celular evidenciada por un aumento de la fluorescencia de actina filamentosa (Figura 47).

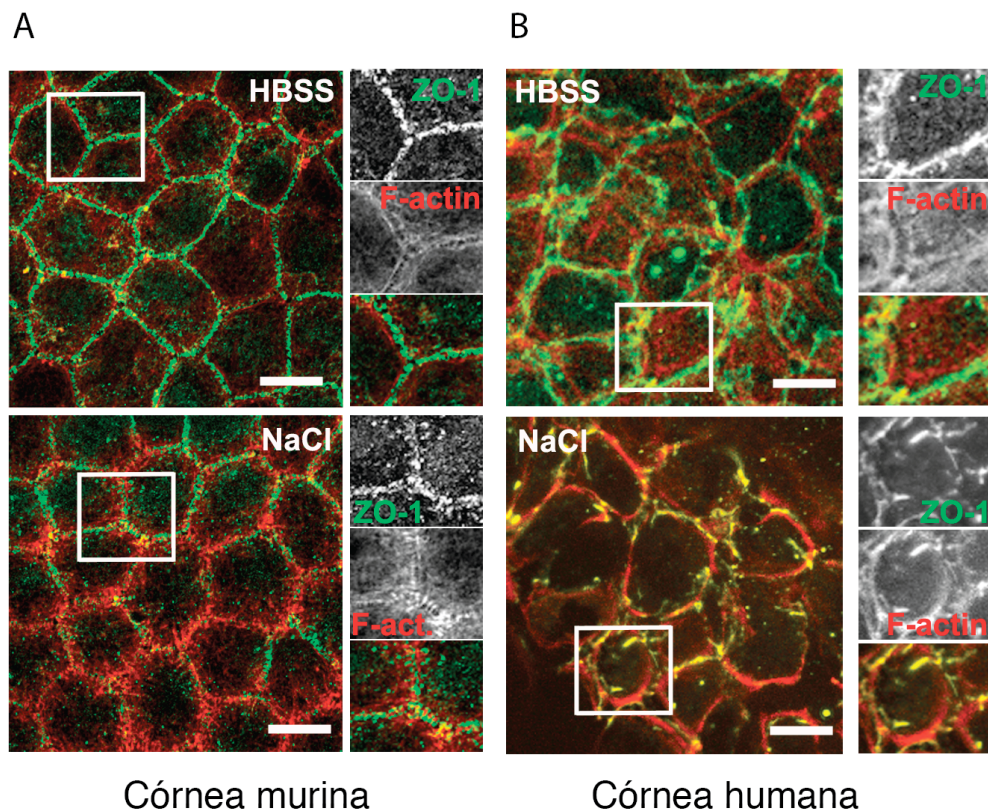


Figura 47: Comparación morfológica de los endotelios murino (A) y primario humano (B), tras la exposición a medio isotónico (fila superior) y a exceso de 225 mM NaCl durante 1 hora (fila inferior). En verde, tinción para ZO-1 y en rojo, tinción para F-actina. La barra de escala representa 5 μ m.

La poca disponibilidad de tejido humano y la incapacidad para controlar todos los factores que afectan a la viabilidad celular, como tiempo de muerte y extracción, tiempo de conservación o manipulación posterior, hace que los experimentos realizados no alcancen significancia suficiente para hacer una estadística, pero nos da una idea aproximada de la similitud de la respuesta frente a estímulos osmóticos de la monocapa endotelial corneal en humano y en nuestro modelo animal, el ratón.



DISCUSIÓN



V. DISCUSIÓN

1. La línea B4G12 como modelo celular para estudiar la función de barrera endotelial

El endotelio corneal es una monocapa de células que tapiza la cara interna de la córnea y que sirve de separación entre el estroma corneal y el humor acuoso. Su función principal es la de mantener el estroma corneal relativamente deshidratado, lo que es requisito imprescindible para la transparencia corneal. La adhesión a la matriz extracelular de las células que forman monocapas confluentes es fundamental para el mantenimiento de su función de barrera (Amado-Azevedo et al., 2014). En la primera parte del trabajo, con la finalidad de mejorar la formación de monocapas *in vitro* en las células B4G12, hemos analizado el comportamiento de estas células en confluencia cuando son sembradas en tres componentes de la matriz extracelular utilizados comúnmente para trabajar *in vitro* con cultivos celulares. Aunque el protocolo original de cultivo indica que las células B4G12 deben ser cultivadas en superficies tapizadas con laminina, nuestros experimentos muestran que el colágeno de rata y la fibronectina son mejores sustratos para conseguir una barrera endotelial lo más confluyente y parecida a la de las células primarias.

La membrana de Descemet funciona como membrana basal del endotelio y está compuesta principalmente por colágeno tipo VIII (Tamura et al., 1991). El colágeno tipo VIII es un tipo de colágeno de cadena corta no fibrilar compuesto por una cadena alfa 1 y una cadena alfa 2. Es un producto de células endoteliales, queratinocitos, células mastoides, endotelio microvascular y de algunos tumores y está presente en diversas matrices extracelulares como en la piel, el glomérulo o la esclera. La distribución y composición de la membrana de Descemet varía a lo largo de la vida por cambios en la tensión que soporta, por la adhesión celular y por el proceso de diferenciación y maduración postnatal (Kabosova et al., 2007). En el momento del nacimiento tiene un grosor de 3 μm y una distribución en bandas. A lo largo de la vida el endotelio va segregando más membrana basal, pero esta carece de patrón bandeado. En la córnea adulta el colágeno tipo VIII se encuentra en la

cara estromal, a diferencia de la córnea en la primera infancia, en la que este tipo de colágeno se encuentra en la cara endotelial. En la córnea adulta la membrana de Descemet en su cara estromal contiene además fibronectina, vitronectina y colágenos tipo IV y VIII. En la cara endotelial tiene colágeno tipo IV y XII, laminina, trombospondina, nidogen y perlecán (Kabosova et al., 2007). El colágeno tipo VIII es producido por las células endoteliales proliferantes en cultivo, pero su producción cesa al alcanzar la confluencia (Kapoor et al., 1988).

Basándonos en los datos morfológicos y funcionales, hemos considerado que el cultivo de la línea celular B4G12 sobre colágeno tipo I de rata produce unas monocapas endoteliales más cercanas al verdadero endotelio humano. Al ser una línea celular inmortalizada se ha perdido la inhibición por contacto, condición *sine qua non* para la proliferación ilimitada, en el proceso de inmortalización, con lo que en todos los casos existe crecimiento en multicapa, siendo este menor en el caso del colágeno tipo I. Todos los tipos de colágeno se pueden dividir en dos grupos, el colágeno fibrilar (I, III, IV, V y XI) y el no fibrilar (los demás tipos). La diferencia entre el colágeno fibrilar y el no fibrilar es que en el último existen segmentos que interrumpen la triple hélice y provocan el plegamiento en otros tipos de estructuras tridimensionales (Sutmuller et al., 1997). La homología entre diferentes tipos de colágeno y el hecho de que el componente mayoritario de la membrana de Descemet sea el colágeno tipo VIII, con presencia de colágeno tipo IV y XII, son quizá la razón de que la monocapa obtenida tenga una estructura más regular y parecida a la fisiológica cuando la línea celular crece sobre colágeno tipo I, aunque este sea fibrilar, frente a otros componentes también presentes en la Descemet, pero en menor cuantía, como laminina o fibronectina.

Aun optimizando las condiciones de cultivo, una vez alcanzada la confluencia de B4G12, la poligonalidad y homogeneidad de la monocapa ha sido inferior al porcentaje considerado normal *in vivo* en todos los casos. La poligonalidad y la homogeneidad son parámetros clínicos que están sujetos a gran variabilidad por edad y raza (Rao et al., 2000; Hashemian et al., 2006, Arıcı et al., 2014; Galgauskas et al., 2013). El coeficiente de variación del área celular (CV) representa la desviación estándar como porcentaje de la media del área celular. Nos da una idea del polimegatismo y clínicamente es el índice más significativo de disfunción endotelial. El CV medio de un endotelio sano adulto varía entre 23 y 40%

dependiendo de la edad y de la raza de la población muestral (Rao et al., 2000; Yunliang et al., 2007; Padilla et al., 2004). El CV de la línea celular cultivada sobre colágeno es cercano al coeficiente de variación del endotelio corneal humano en cultivo primario calculado por Chua et al, de 43,78 +/- 6,99% (Chua et al., 2013) de acuerdo con los artículos de Peh (Peh et al., 2011) y Levis (Levis et al., 2012).

En cuanto al área celular en la literatura científica, el área media de un endotelio sano varía entre 300 y 400 μm^2 (Stefansson et al., 1982; Mustonen et al., 1998) El área media de la línea celular B4G12 crecida sobre colágeno fue de 159,876 +/- 85,7 μm^2 (rango: 20-548 μm^2) y en el cultivo primario de endotelio corneal humano calculado por Chua et al. el área fue 2051 +/- 528 μm^2 , tamaños considerablemente mayores que los observados *in vivo*. Esta diferencia en el tamaño podría ser debida a la capacidad proliferativa. En la línea celular está aumentada gracias al proceso de inmortalización, por lo que las células no tardan en encontrarse con otra célula vecina y establecer contacto, generando monocapas confluentes con células de menor tamaño. En cuanto al tamaño celular de nuestros otros sistemas experimentales utilizados en este trabajo, las células del endotelio de ratón son más pequeñas y regulares, lo que podría explicarse por dos motivos, la edad, ya que es un ratón joven y su endotelio no presenta cambios por el envejecimiento, y el hecho de que en endotelio corneal murino sí tiene capacidad de proliferación *in vivo*. En el caso de la córnea humana, las células son más grandes e irregulares porque proceden de un ojo con descompensación endotelial clínica, en el que se indicó queratoplastia. Al carecer de capacidad proliferativa *in vivo*, la respuesta corneal al daño es la elongación de las células adyacentes a la zona de daño para cubrir el área desnuda (Watsky et al., 1989), por ello a menor densidad celular mayor tamaño celular.

En las inmunofluorescencias de endotelio corneal humano, se observa un doble anillo de actina en la región apical (Figura 46A). Este doble anillo está descrito en la literatura científica en endotelio corneal de conejo (Barry et al., 1995; Gordon et al., 1982; Ichijima et al., 1993), a diferencia de lo descrito en otros epitelios transportadores en los que sólo existe un banda de actina apical que parece continua entre células vecinas. La actina cortical apical en el endotelio corneal se condensa formando una banda circunferencial que conecta con las uniones adherentes y parece no tener contacto con las bandas de células vecinas, a

diferencia de lo que sucede en otros epitelios transportadores. Según lo propuesto por Barry, esta diferencia en la organización podría responder a la diferencia de transporte neto en el endotelio corneal, en el que se produce un movimiento bidireccional, de estroma a acuoso y viceversa, y otros epitelios transportadores en los que el movimiento es unidireccional del lumen a la mucosa (Barry et al., 1995). Este doble anillo de actina se ha denominado PAMR, por perijunctional actomyosin ring. En el endotelio corneal murino (Figura 46B) también observamos el doble PAMR, pero menos marcado que en el endotelio humano ex vivo. Por el contrario, en la línea celular B4G12 (Figura 46C) el doble anillo no se reconoce tan claramente, quizá debido al crecimiento en multicapa y la organización menos regular de esta línea celular inmortalizada.

En cuanto a la distribución de las uniones intercelulares estrechas, analizadas mediante la inmunolocalización de la proteína ZO-1, la distribución en el endotelio de córnea es discontinua, sobre todo a nivel del lugar en el que confluyen tres células, también llamado unión Y, al contrario que en otros epitelios transportadores, donde la intensidad de ZO-1 es mayor en las uniones Y (Stevenson et al., 1986). Esta distribución de la fluorescencia de ZO-1 es observable en el endotelio corneal tanto humano como murino y en menor cuantía en la línea celular (Figura 46 D,E,F). Es una distribución parecida a la descrita en endotelio corneal de conejo (Barry et al., 1995), en la que se proponía que la organización de las uniones intercelulares a nivel de las uniones Y se debe a un gradiente de resistencia en el perímetro celular, con zonas de mayor o menor permeabilidad, siendo las uniones Y los puntos con menor resistencia. La distribución de ZO-1 tiene aspecto espiculado en el ratón y en menor cuantía en la línea celular. Esta distribución dentada intermitente es parecida a lo descrito previamente en endotelios de conejo (Barry et al., 1995) o en endotelio vascular (Millan et al., 2010). En la córnea humana, sin embargo, la distribución es más lineal, hecho que podría explicarse porque la córnea humana procede de un endotelio alterado con baja celularidad y disfuncional, con permeabilidad aumentada y por tanto uniones intercelulares alteradas.

Ya que las células endoteliales no proliferan *in vivo* en el ser humano, es esencial proteger el endotelio corneal del estrés mecánico, inflamatorio y osmótico producido por la cirugía intraocular. Cambios en la osmolaridad y composición de las soluciones intraoculares pueden ser deletéreos para el ojo, las soluciones

hipoosmóticas producen edema y disminución de la transparencia corneal, mientras que las hiperosmóticas producen adelgazamiento corneal (Briggs and McCartney, 1988) y llegan incluso a producir desprendimientos de retina (Marmor et al., 1979). Cabe destacar que, además del daño producido por la cirugía intraocular, en el caso particular en las queratoplastias el endotelio corneal del donante está, además, sometido a una manipulación adicional tras la extracción y el almacenaje. En lo que se refiere al mantenimiento y conservación de tejido humano, se ha demostrado que el rango óptimo de osmolaridad en el líquido de conservación es de 309-350 mOsm/l (Tachaban and Sawa, 2002). Uno de los retos en el campo de banco de tejidos es conseguir un método de almacenamiento a largo plazo, seguro e inocuo para el tejido. La criopreservación, único método que por el momento permite el almacenamiento a largo plazo, produce daño endotelial y por ello sólo algunos bancos de ojos disponen de córneas criopreservadas para queratoplastias de emergencia o injertos tectónicos (Brunette et al., 2001; Yao et al., 2003). La congelación produce daño por dos vías, la formación de hielo intracelular y el daño por la propia solución (VanHorn and Schultz, 1974). La adición de criopreservantes, para evitar el daño producido por el frío, genera cambios bruscos químicos y osmóticos en el medio de conservación que causan contracción y cambios bruscos en el volumen celular (House, 1974).

En el endotelio corneal tiene una resistencia eléctrica transmembrana baja, en comparación con otras monocapas endoteliales y epitelios transportadores. En endotelio corneal cultivado de conejo la resistencia transmembrana es de 28-34 Ωcm^2 (Ma et al., 2007; Geroski and Hadley, 1992) y en endotelio corneal humano primario Noske estableció la resistencia transmembrana en $9 \pm 1,4 \Omega\text{cm}^2$ (Noske et al., 1994) comparado con otras monocapas endoteliales y epitelios transportadores como el del riñón, que varía desde 10 Ωcm^2 en el segmento proximal de la nefrona a 10000 Ωcm^2 en la vejiga (Flores-Benitez et al., 2006), o el cultivo de células endoteliales microvasculares cerebrales en los que la resistencia transmembrana puede alcanzar los 100 Ωcm^2 (Man et al., 2008).

Para el estudio de la función barrera endotelial, en 1992, Ian Giaever desarrolló un método eléctrico para medir la resistencia transendotelial de forma no invasiva y en tiempo real al que denominó sistema de impedancia eléctrica célula-sustrato (ECIS) (Applied BioPhysics, Troy, NY) (Tiruppathi et al., 1992). El aparato

monitoriza tanto el voltaje a través de los electrodos como su fase en relación a la corriente aplicada. Además de recoger la impedancia total, estos datos son convertidos en resistencia y capacitancia al considerar el sistema electrodos-monocapa un circuito de resistencia-capacitancia en serie. Cuando las células se adhieren y crecen sobre los electrodos, la impedancia aumenta al actuar las membranas plasmáticas de la células como aislante, lo que obliga a las corrientes de baja frecuencia a fluir a través de los espacios paracelulares, bajo las células y a través de las uniones. Esta corriente de baja intensidad no produce daño celular, con lo que permite una monitorización de la función barrera de manera no invasiva. Varios autores han demostrado su utilidad en el estudio de la función barrera del endotelio corneal con éxito (Yin, 2005; Srinivas et al., 2004; Jalimarada et al., 2009) y en otros tipos celulares se ha visto una correlación clara entre los datos obtenidos con ECIS y aquellos que utilizan otros sistemas más convencionales, como el de FITC-dextrano en transwells (Marcos-Ramiro et al., 2016).

Los valores absolutos de resistencia obtenidos con el ECIS no son comparables con los obtenidos en estos otros tipos celulares medidos con sistemas TEER diferentes, debido a la naturaleza del diseño del electrodo y la forma en que se hace circular a la corriente eléctrica (Tiruppathi et al., 1992). Se han realizado mediciones en endotelio de córnea de conejo o bovino con el sistema ECIS, pero no en endotelio corneal humano. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se mencionan los valores absolutos de resistencia para estas monocapas, tan solo se reportan cambios relativos, por lo que no pueden ser comparados con nuestros valores absolutos en las células B4G12 (Ramachandran an Srinivas., 2010; Jalimarada et al., 2009; Srinivas et al., 2004). Sin embargo, se han realizado mediciones de resistencia absoluta con el mismo sistema ECIS en otros tipos celulares que forman capas confluentes. Así, sabemos que la TEER media de las células B4G12 es alrededor de 1800 Ω , utilizando una corriente con una frecuencia de 4000 Hz, lo que es ligeramente menor que la resistencia media observada para células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVECs) o las células endoteliales de la microvasculatura humana, que presentan una resistencia media en las mismas condiciones de unos 2000 Ω (Marcos-Ramiro et al., 2016). En cambio, la resistencia en B4G12 es significativamente inferior a la de células de otros epitelios, como en las células epiteliales de riñón (MDCK), que dan una resistencia media de

unos 2500 Ω en este sistema (datos de laboratorio no publicados). Estos resultados sugieren que la integridad de la barrera endotelial de córnea es más parecida a la del endotelio vascular que a la de epitelios polarizados.

2. El citoesqueleto de actomiosina desempeña una doble función en la regulación de la permeabilidad y mantiene la integridad de la barrera endotelial de la córnea

La regulación dinámica de la función barrera y su integridad se han estudiado en monocapas epiteliales y endoteliales como respuesta a múltiples factores: neurohormonales, factores de crecimiento, productos víricos o bacterianos, citoquinas o nutrientes (Mehta and Malik, 2006; Koch and Nusrat, 2009; Capaldo and Nusrat, 2009; Bruewer et al., 2006; Bruewer et al., 2003; Nusrat et al., 2000).

Desde hace más de dos décadas, se sabe que la pérdida de la integridad endotelial es consecuencia de un aumento en las fuerzas centrípetas causadas por contracción de la actomiosina, así como por una disminución de la adhesión intercelular (Madara et al., 1987; Michel and Curry, 1999). La contracción del citoesqueleto de actina cortical genera una fuerza centrípeta que se opone a las fuerzas de unión originadas en las uniones intercelulares, lo que causa disrupción de las mismas y pérdida de la integridad de la barrera (Mehta and Malik, 2006; Michel and Curry, 1999).

El PAMR de las barreras celulares está estructuralmente unido a los componentes transmembrana de las AJ y TJ a través de diferentes proteínas de unión, como alpha-catenina en el caso de las AJ y ZO-1 en el caso de las TJ (Dudek and García, 2001, Turner et al., 1997; Turner, 2000). Hay que destacar que la unión al citoesqueleto de actina subcortical es necesaria para mantener la estabilidad de los complejos de uniones célula-célula.

Por otra parte, la disfunción de las barreras celulares se produce también a través de la contracción mediada por el PAMR, así como por la redistribución de los componentes de TJ y AJ, lo que desemboca en la formación de huecos entre las células y el aumento de la permeabilidad. Muchas de las moléculas involucradas en

el estrés inflamatorio (trombina, histamina, $\text{TNF-}\alpha$) alteran la función barrera a través de mecanismos que aumentan la contracción del PAMR (Watsky et al., 1996; Shivanna et al., 2010; Srinivas, 2006; Satpathy et al., 2004). En las células de músculo liso vascular, endotelio y epitelio, el aumento de fosforilación de MLC produce la formación de haces de actomiosina que provocan contracción celular (Somlyo and Somlyo, 2003). La cuantía de fosforilación de MLC determina la integridad de la función barrera en el endotelio corneal, especialmente en respuesta a factores proinflamatorios (Satpathy et al., 2004; Satpathy et al., 2005, Srinivas et al., 2004; Srinivas, 2006).

Por tanto, los filamentos de actomiosina juegan una doble función, de modo que solo se puede establecer de forma experimental el efecto que tiene la inhibición de cada molécula implicada en la formación de esta red citoesquelética. Así, en nuestros resultados obtenidos con el sistema ECIS, el pretratamiento con diferentes inhibidores que afectan directamente al citoesqueleto de actomiosina, como ML7 (inhibidor de MLCK), blebbistatina (inhibidor de Miosina II no competitivo que mantiene a la miosina en la conformación cerrada, con lo que impide su unión a la actina), produce una disminución de la función barrera de forma constitutiva. Esto podría explicarse porque estamos afectando al citoesqueleto subcortical que mantiene las uniones intercelulares de dos células vecinas, y por tanto, la función barrera íntegra.

Sin embargo, cuando se produce un estrés que provoca contracción celular, los filamentos de actomiosina se inducen en las células B4G12, de forma parecida a lo que se ha detectado en, por ejemplo, el endotelio vascular sometido a un estímulo proinflamatorio y protrombótico como es la trombina. Esto sugiere que la actomiosina, además de mantener la barrera íntegra, participa en la contracción aguda inducida por diferentes tipos de estrés. Sin embargo, los cambios estructurales enormes que produce la inhibición directa de la miosina no parecen una buena estrategia para preservar la barrera endotelial frente al estrés, por lo que decidimos estudiar qué otras proteínas señalizadoras están implicadas en la contracción celular en las barreras endoteliales.

3. Las proteínas ERM y la contracción de las células B4G12

La familia de proteínas Ezrin/radixin/moesin está involucrada en la regulación de procesos que incluyen morfología y migración celular, puesto que actúan como unión entre el citoesqueleto y la membrana plasmática (Fehon et al., 2010). Participan en la regulación de la tensión a la que las células se ven sometidas en respuesta al estrés, controlando la rigidez de la superficie celular y la permeabilidad (Kunda et al., 2008; Titushkin et al., 2013; Aranda et al., 2013). En particular, en el laboratorio ya se había estudiado el papel del ordenamiento de membrana plasmática regulado por las proteínas ERM sobre la función de barrera y la respuesta inflamatoria del endotelio vascular (Aranda et al., 2013), por lo que tras los estudios de inhibición directa de la actomiosina, planteamos la hipótesis de que las proteínas ERM podrían estar involucradas en la respuesta de la barrera endotelial de córnea al estrés osmótico.

En efecto, el choque hiperosmótico produjo una activación significativa de las proteínas ERM, como demuestran los ensayos bioquímicos sobre la fosforilación de la treonina C-terminal. Las comparaciones con otros tipos celulares mejor caracterizados nos llevaron a proponer que la línea celular B4G12 expresa mayoritariamente moesina y en menor cuantía ezrina (Figura 35). El uso del inhibidor de ezrina, sin embargo, no produjo ningún efecto protector de la integridad de la monocapa en la línea celular, tanto en exposiciones cortas como prolongadas al estímulo osmótico en diferentes concentraciones. Esto podría deberse a que este nuevo inhibidor no sea suficientemente potente, como se comprobó en el análisis bioquímico de la fosforilación de las tres proteínas, en el que la incubación con este compuesto no produjo un efecto significativo sobre la fosforilación de las tres proteínas ERM en su conjunto. Deberían realizarse estudios más detallados para determinar si la expresión mayoritaria de moesina en lugar de ezrina previene un efecto significativo del inhibidor de la ezrina sobre las funciones comunes de las tres proteínas ERM en el endotelio de córnea, o si, simplemente, este nuevo inhibidor no es lo suficientemente efectivo. En cualquier caso, no hemos dispuesto de otras herramientas adicionales con las que podamos responder a la pregunta de si la

activación de las proteínas ERM en respuesta al estrés hiperosmótico es relevante durante la disrupción de la barrera endotelial.

4. El estrés osmótico activa el eje RhoA/ROCK como respuesta para preservar la función barrera endotelial

Como se ha mencionado, los reguladores maestros de la proteínas ERMs y de la actomiosina son las proteínas Rho GTPasas, por lo que también hemos investigado su papel en el mantenimiento de la barrera endotelial de córnea. Nuestros resultados muestran que el estrés osmótico activa el eje RhoA-ROCK en la línea celular B4G12 (Figuras 28, 29). Además, la inhibición del principal efector de RhoA, la quinasa ROCK, reduce la fosforilación de MLC en su residuo T18/S19 durante el estrés hiperosmótico, indicando un efecto sobre la actomiosina.

Clásicamente, se ha pensado que RhoA estaba asociada con la pérdida de la función barrera, Rac1 con su mantenimiento y Cdc42 con la estabilización y la recuperación. En los años 90 se demostró que el estímulo con sustancias vasoactivas como endotoxinas, VEGF o trombina activaba el eje RhoA/ROCK, lo que producía una pérdida de la integridad de la barrera acompañada de la formación de fibras de estrés (Eisler et al., 1998). La inhibición farmacológica de ROCK disminuye la contracción, reduce la formación de fibras de estrés y disminuye la permeabilidad en el endotelio vascular (Van Nieuw Amerongen et al., 1998; Hardin et al., 2013, Fernández-Martín et al., 2012). Sin embargo, esta inhibición también induce un aumento de la integridad de la barrera endotelial en ausencia de estímulo contráctil (Van Nieuw Amerongen and Van Hinsbergh, 2007). Esto es debido probablemente a que las Rho GTPasas tienen funciones pleiotrópicas y no sólo controlan los niveles de actomiosina, sino también otros parámetros celulares como la asociación de la actina a las uniones célula-célula y la estabilidad de las mismas (Spindler et al., 2010).

En la línea celular B4G12 la exposición a estrés osmótico activa MLC, RhoA y Rac1. La inhibición del efector downstream de Rho ROCK con Y27632 produce una

disminución de la fosforilación de MLC y se traduce en una atenuación muy modesta de la bajada de resistencia, lo que sugiere que la inhibición de la contracción mediada por actomiosina no es suficiente para prevenir la disrupción de la barrera endotelial. Hay que indicar que Y27632 inhibe parcialmente la contracción mediada por el estímulo protrombótico trombina (Santander-García y Ortega et al. Exp Eye Res., 2016). Esta, aún siendo menor que la observada en el endotelio vascular (Marcos-Ramiro et al., 2016) es significativa, lo que sugiere que la contracción aguda en células endoteliales de córnea es independiente del control de la miosina sobre esta red citoesquelética, al menos parcialmente. Datos adicionales de nuestro laboratorio (Ortega y Santander-García et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science, en prensa) and, muestran que la inhibición farmacológica de RhoA y Rac1 no reduce tampoco la pérdida de barrera inducida por el estrés osmótico, ni el incremento de filamentos de actomiosina, por lo que otras rutas paralelas a Rac y RhoA-ROCK deben estar mediando la contracción de estas células en respuesta al choque osmótico.

¿Qué podría estar controlando la contracción? Una posible respuesta sería la polimerización de actina mediada por forminas (Shao et al., 2015; Grikscheit and Grose, 2016) y no controlada por RhoA y Rac, sino por otras Rho GTPasas no analizadas en este trabajo, como por ejemplo RhoJ (Grikscheit and Grose, 2016), o alternatively, la desintegración de las uniones célula-célula a través de una inhibición y no una activación de la vía de RhoA y Rac en las cercanías de los contactos entre células, provocada por el estrés osmótico.

La posibilidad de que la inhibición de estas dos GTPasas contribuya a la pérdida de función de barrera puede parecer contradictoria con los datos bioquímicos obtenidos con los ensayos de *pulldown*, en los que RhoA y Rac1 no disminuyen, sino que incrementan su carga GTP y por tanto su actividad en respuesta al estrés osmótico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en estos ensayos las células no son sometidas a una señalización específica que induce un cambio fisiológico que no es dañino, sino que las células responden a un estrés ambiental deletéreo que puede disparar cascadas de señalización que tengan como finalidad recuperar la homeostasis y garantizar la supervivencia. En este sentido, se decidió probar esta hipótesis con un activador de la familia de Rho que activa Rho, Rac y Cdc42 derivado de la exotoxina Factor necrotizante citotóxico (CNF) de

Escherichia coli (Rho/Rac/Cdc42 Activator I) (Aepfelbacher and Eisler, 2001) y con un activador que activa únicamente Rho (Rho Activator II) proveniente de modificaciones estructurales en la misma toxina, frente al estrés osmótico. De este modo, imitamos las señales endógenas disparadas en respuesta al estrés osmótico con estos activadores, la función de barrera mejoró significativamente, la resistencia transendotelial se incrementó (Figura 43) y ayudamos a recuperar la homeostasis más rápidamente (Figura 44).

Hay que destacar que los dos principales efectores de RhoA, ROCK y la formina mDia participan en la formación de fibras de actomiosina y podrían contribuir al mantenimiento de la barrera endotelial. ROCK actuaría sobre la contracción a través de MLC y mDia1, a través de la polimerización de actina *de novo*. Pero, además, en varios estudios se ha propuesto un posible papel de mDia en la regulación de la formación y mantenimiento de las uniones adherentes (Sahai and Marshall, 2002; Carramusa et al., 2007) y puede tener un papel en la polaridad durante el desarrollo embrionario (Thumkeo et al., 2011). A pesar de esto, la vía de mDia ha sido relativamente poco estudiada, por dificultades técnicas en el estudio de las forminas, ya que existen menos herramientas disponibles para detectar o inhibir su actividad.

La formación de fibras de actina, por ejemplo, en el PAMR, depende de RhoA y se ha propuesto que el balance entre ambos efectores, mDia1 y ROCK, es lo que determina la formación de diferentes fibras de actina de grosor y densidad (Narumiya et al., 1999). La quinasa ROCK participaría de varias maneras en la reorganización del citoesqueleto de actina a través de RhoA: en primer lugar, controlando la polimerización de actina al fosforilar a MLC e inhibir MLCP (Amano et al., 1996); después, regulando la actividad de la quinasa PIP4P5, reguladora del citoesqueleto de actomiosina (Sechi and Wehland, 2000); y, por último, activando LIMK, que fosforila e inactiva a proteínas encargadas de fragmentar los filamentos de actina (Arber et al., 1998). Por otro lado, RhoA se une a mDia y produce un cambio de conformación que promueve la polimerización de actina por un mecanismo desconocido. Todo esto contribuye a que RhoA pueda desempeñar funciones complementarias e incluso antagónicas, dependiendo del contexto celular (Narumiya et al., 1999).

También se ha demostrado un posible papel antagonista de ROCK y mDia en la adhesión célula-célula en epitelio. Rho puede favorecer la disrupción de las uniones intercelulares a través de ROCK, mientras que la señalización downstream a través de Dia mantiene las uniones adherentes estables. Esto tendría sentido durante la remodelación tisular en la que sería beneficioso tener dos vías opuestas por debajo de Rho; ROCK podría generar fuerzas contráctiles que alterarían las uniones intercelulares permitiendo la remodelación, mientras que la capacidad de Rho a través de mDia de localizar componentes de las AJ hacia la periferia y promover la formación de complejos cadherina-catenina prevendría de la total disrupción de la integridad epitelial. Después de la remodelación, el establecimiento de confluencia disminuiría la actividad de Rho de manera dependiente de cadherina (Sahai and Marshall, 2002). En esta dualidad en la señalización de Rho y Rac, sería interesante estudiar el patrón de expresión de forminas en el endotelio de córnea y su posible papel en su función de barrera.

El efecto beneficioso de los activadores de RhoA y Rac1 no sólo lo hemos observado en la línea celular B4G12. Experimentos posteriores en modelos experimentales *ex vivo* de córnea murina, que no se han presentado en esta memoria, pero se adjuntan en uno de los manuscritos que la acompañan, muestran claramente una recuperación de la integridad de las uniones intercelulares endoteliales en presencia de estos activadores (Ortega y Santander et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, en revisión).

El endotelio corneal humano *in vivo* no se divide y como respuesta al daño las células vecinas se agrandan y desplazan para cubrir el espacio desnudo. Para que tras el daño se recupere la función barrera es imprescindible la reformación y maduración de las uniones intercelulares. La reformación de las uniones y restablecimiento de la función barrera también es importante en la recuperación tras la exposición a estrés inflamatorio, como el que se produce tras la cirugía intraocular o en el rechazo corneal. Por tanto, nuestros resultados sugieren que los activadores de Rac1 y RhoA podrían ser útiles en estos escenarios en los que la barrera endotelial se ve afectada.

Los activadores de Rho GTPasas favorecen la recuperación de la barrera tras el estrés osmótico. La inhibición de la señalización RhoA-ROCK, mostrada en esta

tesis y en uno de los manuscritos adjuntos, la retrasa significativamente. Estos últimos resultados concuerdan con trabajos previos del grupo de Srinivas en la escuela de Optometría en Universidad de Indiana, en los que la monocapa de células endoteliales de córnea de conejo son sometidas a un estímulo artificial para perturbar la barrera endotelial eliminando el calcio del medio. El calcio es un ión necesario para la formación de las uniones intercelulares. En estos ensayos denominados “calcium switch” se activa RhoA, se produce contracción del PAMR y redistribución de los componentes de las uniones estrechas ZO-1 y Cadherinas. Esto se traduce en una bajada brusca de la TEER que tras la reintroducción del calcio en el medio muestra una recuperación paulatina y progresiva. Este aumento de la resistencia se debe a la reformación de las uniones intercelulares (Ramachandran and Srinivas, 2010). Hay que destacar que tras la exposición en endotelio corneal bovino a Y-27632 (inhibidor de ROCK) y blebbistatina (inhibidor de Miosina II ATPasa), se produce una inhibición de la recuperación de la función barrera cuando se restablecen las concentraciones normales de calcio, puesto que es necesario un tono contráctil para la reformación de las uniones estrechas (Srinivas, 2012). Esto es parecido a lo observado durante el estrés osmótico en nuestras células. Sin embargo, en el caso del “calcium switch”, estos dos compuestos también inhiben parcialmente el aumento de permeabilidad tras la depleción de calcio, lo que indica que la desestructuración de las uniones adherentes depende de la contracción de la actomiosina.

El efecto positivo del activador de Rac1 sobre la función de barrera endotelial es menos sorprendente que lo observado para el activador de RhoA. Rac1 es una GTPasa cuyo papel en la estabilidad de las uniones célula-célula se ha demostrado en muchos tipos celulares (Erasmus et al., 2015, Beckers et al., 2010). La actividad de Rac1 aumenta mientras se establecen las uniones intercelulares (Noren et al., 2001) y se ha asociado al realineamiento de las uniones tras el estímulo de agentes vasoactivos como la trombina, el factor de crecimiento vascular endotelial o VEGF, o el TNF α a través de receptores acoplados a proteínas G (Kouklis et al., 2004; Marcos-Ramiro et al., 2016). La función de Rac en el mantenimiento de las uniones se da a varios niveles, puede generar protrusiones dependiente de actina, a través del complejo wave, que controla la polimerización de actina dependiente de Rac. Esto facilitaría la formación de los contactos intracelulares (Marcos-Ramiro et al., 2016;

Yamazaki et al., 2007). Esto favorece el inicio de los contactos intercelulares, donde se acumulan GEFs específicas de Rac1, que sirven como sistema de retroalimentación positiva, favoreciendo la polimerización local de actina que estabiliza las uniones intercelulares (Yamazaki et al., 2007).

Una misma Rho GTPasa, como hemos visto, puede formar parte de vías de señalización que tengan efectos opuestos sobre las uniones intercelulares. Para asegurar el mantenimiento y el funcionamiento óptimo de la función barrera del endotelio, es de vital importancia regular de forma fina la activación de las Rho GTPasas, tanto espacial como temporalmente. Ejemplos de esta regulación fina espacio-temporal en el endotelio vascular son el GEF Trio y Asef.

El factor de intercambio Trio actúa como integrador de diferentes vías al poseer múltiples dominios, entre ellos dos dominios GEF con diferente especificidad capaz de activar a RhoA, Rac1 y RhoG y se comporta como regulador de las uniones adherentes en el endotelio (Van Rijssel and Van Buul, 2012). En el proceso de reformación de las uniones intercelulares, lo primero que se produce es la activación de Rac1 en la periferia celular de manera independiente de Trio y la formación de lamelipodios. Los lamelipodios de células adyacentes crecen hasta establecer contacto. A continuación, se establecen interacciones entre las moléculas de VE cadherina de células adyacentes que provocan el reclutamiento de Trio a las uniones, su unión a VE cadherina y una activación localizada de Rac1 que favorece la reorganización del citoesqueleto de actina promoviendo la estabilización y maduración de las uniones. Así mismo si se desestabilizan las uniones Trio se disocia de VE-cadherina impidiendo la activación de Rac a ese nivel (Van Buul and Timmerman, 2015).

Asef es un factor de intercambio con especificidad para Rac1 que es capaz de activar a Rac1 y Cdc42 y que se ha propuesto como controlador de la permeabilidad y recuperación de las uniones en el daño endotelial pulmonar agudo (Tian et al., 2015). Asef tiene un papel crítico en la remodelación del citoesqueleto a través de dos mecanismos: la activación de las dinámicas de actina, que permite la extensión y el cierre de huecos en la monocapa y la formación de las uniones intercelulares. El aumento localizado de la actividad de Rac1 en la periferia es crítico para el restablecimiento de las uniones intercelulares. Por tanto, sería de interés prioritario

investigar la expresión y distribución de estas GEFs en el endotelio de córnea y en la línea celular B4G12.

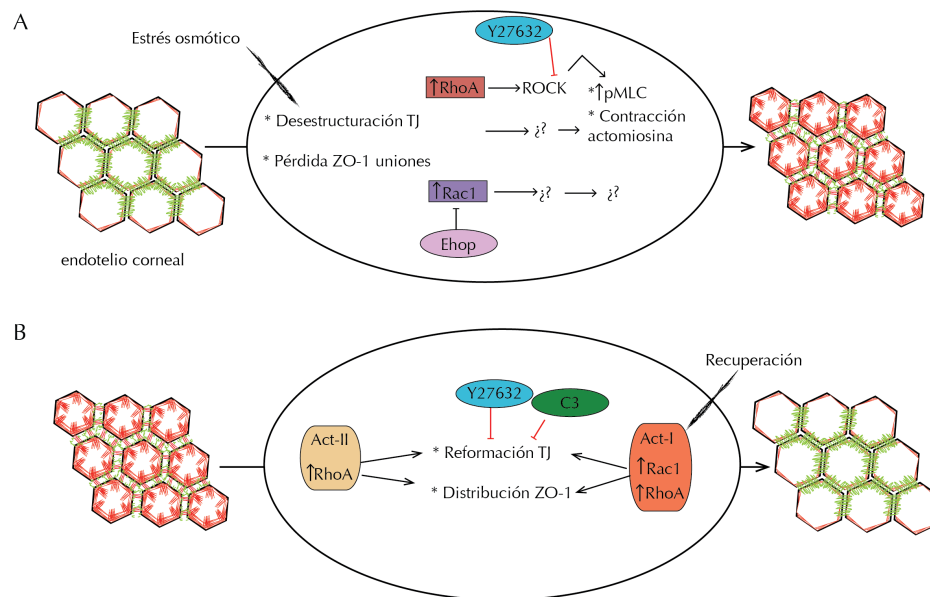


Figura 48: Nuestro modelo de respuesta de las células endoteliales corneales frente al estrés osmótico. A) Tras la exposición a estrés osmótico, se produce una activación de RhoA y Rac1 y una pérdida de función barrera. La inhibición de ROCK atenúa ligeramente la contracción. B) Tras el cese del estrés osmótico, para el proceso de recuperación de la función barrera, que incluye la reorganización de las uniones estrechas y la redistribución de ZO-1, es necesaria la activación de RhoA y Rac1.

La complejidad de esta regulación aumenta, ya que las Rho GTPasas pueden modular las uniones intercelulares de forma directa y de forma indirecta, al establecerse interacciones entre las cadherinas, que forman parte de las uniones adherentes y que pueden a su vez estimular o inhibir las actividades de las Rho GTPasas (Fukata and Kaibuchi, 2001; Yap and Kovacs, 2003; Timmerman et al., 2015).

En resumen, la regulación de estas GTPasas es compleja, puesto que es necesario un nivel de activación basal que genere cierta rigidez en la célula y estabilidad en las uniones intercelulares, y dada la importancia que tiene en el mantenimiento de la forma y estructura celulares, así como en otras funciones celulares, podría pensarse que las vías están interconectadas y sujetas a una fina regulación tanto espacial como temporal. El acceso a técnicas novedosas como la

microscopía de alta resolución podría clarificar algunos aspectos aún desconocidos de la complicada regulación de las Rho GTPasas.

La descripción de las cascadas de señalización tras la exposición a estrés osmótico y el mejor entendimiento de los mecanismos que regulan la función barrera en el endotelio corneal, así como la puesta a punto de un modelo animal para poder realizar experimentos *in vivo*, son herramientas necesarias para poder desarrollar en un futuro estrategias farmacológicas para el tratamiento de la disfunción endotelial. Nuestros resultados han diseccionado las vías de señalización inducidas durante la alteración de la barrera endotelial en respuesta al estrés osmótico y han encontrado que la activación farmacológica de RhoA y Rac preserva la barrera del endotelio corneal de forma constitutiva y en respuesta al estrés. La utilidad de estos compuestos como tratamientos en patologías relacionadas con esta función de barrera debería ser investigada en un futuro cercano.





CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES

- 1.- La línea B4G12 forma monocapas celulares confluentes más parecidas al endotelio humano primario y con mejores propiedades de barrera cuando crecen sobre colágeno tipo I en superficies plásticas, pero no en superficies de vidrio.
- 2.- El citoesqueleto de actomiosina mantiene la integridad de la barrera endotelial de la córnea.
- 3.- El estrés osmótico activa las rutas de señalización controladas por RhoA/ROCK y Rac1 e induce contracción celular y una desintegración transitoria de la barrera endotelial de córnea
- 4.- La inhibición del principal efector de RhoA, la quinasa ROCK, reduce la fosforilación de MLC en su residuo T18/S19 y de las proteínas ERMs en su residuo Thr567/Thr564/Thr558 durante el estrés hiperosmótico.
- 5.- La inhibición de Rac1 con Ehop-016 no tiene un efecto significativo sobre la fosforilación de las proteínas MLC y ERMs
- 6.- La inhibición de las rutas de de señalización controladas por RhoA y Rac1 no previene el aumento de permeabilidad tras el estrés osmótico y retarda su recuperación.
- 7.- La activación tanto de RhoA como de Rac1 incrementa la integridad de la barrera endotelial de córnea y favorece su recuperación tras el estrés osmótico, lo que sugiere que la activación de dichas vías podría formar parte de una respuesta celular para recuperar la homeostasis de la barrera endotelial.
- 8.- Es posible obtener córneas murinas con su endotelio íntegro para realizar estudios *ex vivo* sobre la respuesta del endotelio corneal al estrés osmótico.





BIBLIOGRAFÍA



VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adyshev, D.M., S.M. Dudek, N. Moldobaeva, K.M. Kim, S.-F. Ma, A. Kasa, J.G.N. Garcia, and A.D. Verin. 2013. Ezrin/radixin/moesin proteins differentially regulate endothelial hyperpermeability after thrombin. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 305:L240–55. doi:10.1152/ajplung.00355.2012.
- Aepfelbacher, M., and M. Essler. 2001. Disturbance of endothelial barrier function by bacterial toxins and atherogenic mediators: a role for Rho/Rho kinase. *Cell. Microbiol.* 3:649–658.
- Amado-Azevedo, J., E.T. Valent, and G.P. Van Nieuw Amerongen. 2014. Regulation of the endothelial barrier function: a filum granum of cellular forces, Rho-GTPase signaling and microenvironment. *Cell Tissue Res.* 355:557–576. doi:10.1007/s00441-014-1828-6.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271:20246–20249.
- Amsellem, V., N.H. Dryden, R. Martinelli, F. Gavins, L.O. Almagro, G.M. Birdsey, D.O. Haskard, J.C. Mason, P. Turowski, and A.M. Randi. 2014. ICAM-2 regulates vascular permeability and N-cadherin localization through ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins and Rac-1 signalling. *Cell Commun. Signal.* 12:12. doi:10.1186/1478-811X-12-12.
- Anderson, N.J., D.Y. Badawi, H.E. Grossniklaus, and R.D. Stulting. 2001. Posterior polymorphous membranous dystrophy with overlapping features of iridocorneal endothelial syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 119:624–625.
- Aranda, J.F., N. Reglero-Real, B. Marcos-Ramiro, A. Ruiz-Sáenz, L. Fernandez-Martin, M. Bernabé-Rubio, L. Kremer, A.J. Ridley, I. Correas, M.A. Alonso, and J. Millán. 2013. MYADM controls endothelial barrier function through ERM-dependent regulation of ICAM-1 expression. *Mol. Biol. Cell.* 24:483–494. doi:10.1091/mbc.E11-11-0914.
- Arber, S., F.A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C.A. Stanyon, O. Bernard, and P. Caroni. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature.* 393:805–809. doi:10.1038/31729.
- Armitage, W.J., S.J. Moss, and D.L. Easty. 1988. Effects of osmotic stress on rabbit corneal endothelium. *Cryobiology.* 25:425–439.

- Arıcı, C., O.S. Arslan, and F. Dikkaya. 2014. Corneal endothelial cell density and morphology in healthy Turkish eyes. *J Ophthalmol.* 2014:852624. doi:10.1155/2014/852624.
- Arriola- Villalobos, P., Diaz-Valle D., Güell J.L, Iradier-Urrutia M.T., Jimenez-Alfaro I., Cuiña-Sardiña, R., and Benitez-del-Castillo J.M. 2009. Intrastromal corneal ring segment implantation for high astigmatism after penetrating keratoplasty. *Journal of Cartaract & Refractive Surgery.* 35:1878–1884. doi:10.1016/j.jcrs.2009.05.060.
- Bain, J., H. McLauchlan, M. Elliott, and P. Cohen. 2003. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* 371:199–204. doi:10.1042/BJ20021535.
- Barreiro, O., M. Yanez-Mo, J.M. Serrador, M.C. Montoya, M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, H. Furthmayr, and F. Sanchez-Madrid. 2002. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J. Cell Biol.* 157:1233–1245. doi:10.1083/jcb.200112126.
- Barry, P.A., Petroll, W.M., Andrews, P.M., Cavanagh, H.D. and Jester J.V.. 1995. The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 36:1115–1124.
- Bartakova, A., Kunzevitzky, N.J., Goldberg, J.L.,. 2014. Regenerative Cell Therapy for Corneal Endothelium. *Current ophthalmology reports.* 2:81. doi:10.1007/s40135-014-0043-7.
- Barzik, M., T.I. Kotova, H.N. Higgs, L. Hazelwood, D. Hanein, F.B. Gertler, and D.A. Schafer. 2005. Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J. Biol. Chem.* 280:28653–28662. doi:10.1074/jbc.M503957200.
- Bazzoni, G., and E. Dejana. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* 84:869–901. doi:10.1152/physrev.00035.2003.
- Beckers, C.M.L., V.W.M. van Hinsbergh, and G.P. van Nieuw Amerongen. 2010. Driving Rho GTPase activity in endothelial cells regulates barrier integrity. *Thromb Haemost.* 103:40–55. doi:10.1160/TH09-06-0403.
- Ben Ali, R., A. Klouz, N. Elkadri, N. Kourda, E. Gaies, D. Ben Saïd, M. Lakhal, and C. Belkahia. 2009. Effect of liver hypothermic preservation: exploration and protection. *Eur Surg Res.* 43:348–353. doi:10.1159/000241716.
- Benjamin W Iliff, S.A.R.J.D.G. 2012. The genetics of Fuchs’ corneal dystrophy. *Expert review of ophthalmology.* 7:363. doi:10.1586/eop.12.39.

- Bezanilla, M., A.S. Gladfelter, D.R. Kovar, and W.-L. Lee. 2015. Cytoskeletal dynamics: a view from the membrane. *J. Cell Biol.* 209:329–337. doi:10.1083/jcb.201502062.
- Bhavsar, P.J., E. Infante, A. Khwaja, and A.J. Ridley. 2013. Analysis of Rho GTPase expression in T-ALL identifies RhoU as a target for Notch involved in T-ALL cell migration. *Oncogene*. 32:198–208. doi:10.1038/onc.2012.42.
- Biswas, S., F.L. Munier, J. Yardley, N. Hart-Holden, R. Perveen, P. Cousin, J.E. Sutphin, B. Noble, M. Batterbury, C. Kielty, A. Hackett, R. Bonshek, A. Ridgway, D. McLeod, V.C. Sheffield, E.M. Stone, D.F. Schorderet, and G.C. Black. 2001. Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the alpha2 chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 10:2415–2423.
- Blanchoin, L., T.D. Pollard, and R.D. Mullins. 2000. Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol.* 10:1273–1282.
- Bonanno, J.A. 2001. Effects of contact lens-induced hypoxia on the physiology of the corneal endothelium. *Optometry and Vision Science*. 78:783–790.
- Bonanno, J.A. 2003. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* 22:69–94.
- Bourne, W.M., and R.F. Brubaker. 1992. Progression and regression of partial corneal involvement in the iridocorneal endothelial syndrome. *AJOPHT.* 114:171–181.
- Bourne, W.M., D.O. Hodge, and J.W. McLaren. 1999. Estimation of corneal endothelial pump function in long-term contact lens wearers. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 40:603–611.
- Bourne, W.M., L.R. Nelson, and D.O. Hodge. 1997. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 38:779–782.
- Breitsprecher, D., and B.L. Goode. 2013. Formins at a glance. *J. Cell. Sci.* 126:1–7. doi:10.1242/jcs.107250.
- Brieher, W. 2013. Mechanisms of actin disassembly. *Mol. Biol. Cell.* 24:2299–2302. doi:10.1091/mbc.E12-09-0694.
- Brieher, W.M., and A.S. Yap. 2013. Cadherin junctions and their cytoskeleton(s). *Curr. Opin. Cell Biol.* 25:39–46. doi:10.1016/j.ceb.2012.10.010.
- Briggs, R.B., and D.L. McCartney. 1988. Balanced salt solution infusion alert. *Arch. Ophthalmol.* 106:718.

- Bruewer, M., A. Luegering, T. Kucharzik, C.A. Parkos, J.L. Madara, A.M. Hopkins, and A. Nusrat. 2003. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J. Immunol.* 171:6164–6172.
- Bruewer, M., S. Samarin, and A. Nusrat. 2006. Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072:242–252. doi:10.1196/annals.1326.017.
- Bruinsma, B.G., T.A. Berendsen, M.-L. Izamis, H. Yeh, M.L. Yarmush, and K. Uygun. 2015. Supercooling preservation and transplantation of the rat liver. *Nat Protoc.* 10:484–494. doi:10.1038/nprot.2015.011.
- Brunette, I., M. Le François, M.C. Tremblay, and M.C. Guertin. 2001. Corneal transplant tolerance of cryopreservation. *Cornea.* 20:590–596.
- Bulut, G., S.-H. Hong, K. Chen, E.M. Beauchamp, S. Rahim, G.W. Kosturko, E. Glasgow, S. Dakshanamurthy, H.-S. Lee, I. Daar, J.A. Toretzky, C. Khanna, and A. Üren. 2011. Small molecule inhibitors of ezrin inhibit the invasive phenotype of osteosarcoma cells. *Oncogene.* 31:269–281. doi:10.1038/onc.2011.245.
- Burridge, K., and K. Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 116:167–179.
- Buzard, K., J.-R. Zhang, G. Thumann, R. Stripecke, and M. Sunalp. 2010. Two cases of toxic anterior segment syndrome from generic trypan blue. *Journal of Cataract & Refractive Surgery.* 36:2195–2199. doi:10.1016/j.jcrs.2010.09.017.
- Cain, R.J., B. Vanhaesebroeck, and A.J. Ridley. 2010. The PI3K p110alpha isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. *J. Cell Biol.* 188:863–876. doi:10.1083/jcb.200907135.
- Camposampiero, D., R. Tiso, E. Zanetti, A. Ruzza, A. Bruni, and D. Ponzin. 2003. Improvement of human corneal endothelium in culture after prolonged hypothermic storage. *Eur J Ophthalmol.* 13:745–751.
- Canals, M., and J. Costa. 1995. Técnicas de conservación corneal. *Annals d'Oftalmol.*
- Capaldo, C.T., and A. Nusrat. 2009. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788:864–871. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.027.
- Caprioli, J. 1992. The ciliary epithelia and aqueous humor. *Adler's Physiology of the Eye: Clinical*
- Carlson, K.H., and W.M. Bourne. 1988. Endothelial morphologic features and function after long-term extended wear of contact lenses. *Arch. Ophthalmol.* 106:1677–1679.

- Carramusa, L., C. Ballestrem, Y. Zilberman, and A.D. Bershadsky. 2007. Mammalian diaphanous-related formin Dia1 controls the organization of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. *J. Cell. Sci.* 120:3870–3882. doi:10.1242/jcs.014365.
- Chandhoke, S.K., and M.S. Mooseker. 2012. A role for myosin IXb, a motor-RhoGAP chimera, in epithelial wound healing and tight junction regulation. *Mol. Biol. Cell.* 23:2468–2480. doi:10.1091/mbc.E11-09-0803.
- Chang, J.H., E.E. Gabison, T. Kato, and D.T. Azar. 2001. Corneal neovascularization. *Current Opinion in Ophthalmology*. 12:242–249.
- Chang, Y.-C., P. Nalbant, J. Birkenfeld, Z.-F. Chang, and G.M. Bokoch. 2008. GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol. Biol. Cell.* 19:2147–2153. doi:10.1091/mbc.E07-12-1269.
- Chesarone, M.A., and B.L. Goode. 2009. Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21:28–37. doi:10.1016/j.ceb.2008.12.001.
- Christo, C.G., J. van Rooij, A.J. Geerards, L. Remeijer, and W.H. Beekhuis. 2001. Suture-related complications following keratoplasty: a 5-year retrospective study. *Cornea*. 20:816–819.
- Chua, J.S., L.X. Liew, and E.K.F. Yim. 2013. Cultivation of human microvascular endothelial cells on topographical substrates to mimic the human corneal endothelium. *J Funct Biomater*. 4:38–58. doi:10.3390/jfb4010038.
- Citi, S., D. Spadaro, Y. Schneider, J. Stutz, and P. Pulimeno. 2011. Regulation of small GTPases at epithelial cell-cell junctions. *Mol. Membr. Biol.* 28:427–444. doi:10.3109/09687688.2011.603101.
- Cornea Donor Study Investigator Group, J.H. Lass, R.L. Gal, M. Dontchev, R.W. Beck, C. Kollman, S.P. Dunn, E. Heck, E.J. Holland, M.J. Mannis, M.M. Montoya, R.L. Schultze, R.D. Stulting, A. Sugar, J. Sugar, B. Tennant, and D.D. Verdier. 2008. Donor age and corneal endothelial cell loss 5 years after successful corneal transplantation. Specular microscopy ancillary study results. *Ophthalmology*. 115:627–632.e8. doi:10.1016/j.ophttha.2008.01.004.
- Courville, C.B., M.K. Smolek, and S.D. Klyce. 2004. Contribution of the ocular surface to visual optics. *Experimental Eye Research*. 78:417–425.
- D'hondt, C., R. Ponsaerts, S.P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens. 2007. Thrombin Inhibits Intercellular Calcium Wave Propagation in Corneal Endothelial Cells by Modulation of Hemichannels and Gap Junctions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 48:120–133. doi:10.1167/iovs.06-0770.

- De Araujo, A.L. 2015. Corneal stem cells and tissue engineering: Current advances and future perspectives. *WJSC*. 7:806. doi:10.4252/wjsc.v7.i5.806.
- De Brabander, M., De May J, J. M, and G. G. Ultrastructural immunocytochemical distribution of tubulin in cultured cells treated with microtubule inhibitors. *Cell Biol Int Rep*. 1977 Mar;1(2):177-83.
- Dejana, E., M. Corada, and M.G. Lampugnani. 1995. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J*. 9:910–918.
- Denker, B.M., and S.K. Nigam. 1998. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am. J. Physiol*. 274:F1–9.
- Diamond, J.M., and W.H. Bossert. 1967. Standing-gradient osmotic flow. A mechanism for coupling of water and solute transport in epithelia. *J. Gen. Physiol*. 50:2061–2083.
- Diecke, F.P., V.I. Cacace, N. Montalbetti, L. Ma, K. Kuang, P. Iserovich, and J. Fischbarg. 2011. Comparative Permeabilities of the Paracellular and Transcellular Pathways of Corneal Endothelial Layers. *J Membrane Biol*. 242:41–51. doi:10.1007/s00232-011-9375-5.
- Dovas, A., and J.R. Couchman. 2005. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem. J*. 390:1–9. doi:10.1042/BJ20050104.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*. 123:903–915. doi:10.1016/j.cell.2005.09.021.
- Dua, H.S., L.A. Faraj, D.G. Said, T. Gray, and J. Lowe. 2013. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology*. 120:1778–1785. doi:10.1016/j.opthta.2013.01.018.
- Dudek, S.M., and García, G.J. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J. Appl. Physiol*. 91:1487–1500.
- D'hondt, C., J. Iyyathurai, B. Himpens, L. Leybaert, and G. Bultynck. 2014. Cx43-hemichannel function and regulation in physiology and pathophysiology: insights from the bovine corneal endothelial cell system and beyond. *Front Physiol*. 5:348. doi:10.3389/fphys.2014.00348.
- Ebrahim, S., T. Fujita, B.A. Millis, E. Kozin, X. Ma, S. Kawamoto, M.A. Baird, M. Davidson, S. Yonemura, Y. Hisa, M.A. Conti, R.S. Adelstein, H. Sakaguchi, and B. Kachar. 2013. NMII forms a contractile transcellular sarcomeric network to regulate apical cell junctions and tissue geometry. *Curr. Biol*. 23:731–736. doi: 10.1016/j.cub.2013.03.039.

-
- Edelhauser, H.F. 2000. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. *Cornea*. 19:263–273.
 - Edelhauser, H.F. 2006. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 47:1754–1767. doi:10.1167/iovs.05-1139.
 - Edelhauser, H.F., A.M. Hanneken, H.J. Pederson, and D.L. Van Horn. 1981. Osmotic tolerance of rabbit and human corneal endothelium. *Arch. Ophthalmol.* 99:1281–1287.
 - Edgar, D., R. Timpl, and H. Thoenen. 1984. The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *The EMBO Journal*. 3:1463–1468.
 - Ehlers, N. 1966. Variations in hydration properties of the cornea. *Acta Ophthalmologica*. 44:461–471.
 - Eleftheriadis, H., M. Cheong, S. Sandeman, P.P. Syam, P. Brittain, G.K. Klintworth, A. Lloyd, and C. Liu. 2002. Corneal toxicity secondary to inadvertent use of benzalkonium chloride preserved viscoelastic material in cataract surgery. *British Journal of Ophthalmology*. 86:299–305.
 - Elhalis, H., B. Azizi, and U.V. Jurkunas. 2010. Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Ocul Surf.* 8:173–184.
 - Erasmus, J.C., N.J. Welsh, and V.M.M. Braga. 2015. Cooperation of distinct Rac-dependent pathways to stabilise E-cadherin adhesion. *Cellular Signalling*. 27:1905–1913. doi:10.1016/j.cellsig.2015.04.014.
 - Essler, M., M. Amano, H.J. Kruse, K. Kaibuchi, P.C. Weber, and M. Aepfelbacher. 1998. Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273:21867–21874.
 - Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629–635. doi:10.1038/nature01148.
 - Fares, U., A.A. Mokashi, M.A. Al-Aqaba, A.M. Otri, A. Miri, and H.S. Dua. 2013. Management of postkeratoplasty astigmatism by paired arcuate incisions with compression sutures. *Br J Ophthalmol.* 97:438–443. doi:10.1136/bjophthalmol-2012-302128.
 - Fehon, R.G., A.I. McClatchey, and A. Bretscher. 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:276–287. doi:10.1038/nrm2866.
 - Fernandez-Martin, L., B. Marcos-Ramiro, C.L. Bigarella, M. Graupera, R.J. Cain, N. Reglero-Real, A. Jiménez, E. Cernuda-Morollón, I. Correias, S. Cox, A.J. Ridley,

- and J. Millán. 2012. Crosstalk between reticular adherens junctions and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial barrier function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 32:e90–102. doi:10.1161/ATVBAHA.112.252080.
- Fini, M.E., and B.M. Stramer. 2005. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea*. 24:S2–S11.
 - Fischbarg, J. 1972. Potential difference and fluid transport across rabbit corneal endothelium. *Biochim. Biophys. Acta*. 288:362–366.
 - Fischbarg, J. 2010. Fluid transport across leaky epithelia: central role of the tight junction and supporting role of aquaporins. *Physiol. Rev.* 90:1271–1290. doi:10.1152/physrev.00025.2009.
 - Fischbarg, J., and J.J. Lim. 1974. Role of cations, anions and carbonic anhydrase in fluid transport across rabbit corneal endothelium. *The Journal of Physiology*. 241:647–675.
 - Flores-Benitez, D., A. Ruiz-Cabrera, C. Flores-Maldonado, L. Shoshani, M. Cereijido, and R.G. Contreras. 2006. Control of tight junctional sealing: role of epidermal growth factor. *AJP: Renal Physiology*. 292:F828–F836. doi:10.1152/ajprenal.00369.2006.
 - Fuchsluger, T.A., U. Jurkunas, A. Kazlauskas, and R. Dana. 2011. Corneal Endothelial Cells Are Protected from Apoptosis by Gene Therapy. *Human Gene Therapy*. 22:549–558. doi:10.1089/hum.2010.079.
 - Fukata, M., and K. Kaibuchi. 2001. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:887–897. doi:10.1038/35103068.
 - García, G.J., H.W. Davis, and C.E. Patterson. 1995. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J. Cell. Physiol*. 163:510–522. doi:10.1002/jcp.1041630311.
 - Gabison, E.E., E. Huet, C. Baudouin, and S. Menashi. 2009. Direct epithelial-stromal interaction in corneal wound healing: Role of EMMPRIN/CD147 in MMPs induction and beyond. *Prog Retin Eye Res*. 28:19–33. doi:10.1016/j.preteyeres.2008.11.001.
 - Galgauskas, S., D. Norvydaitė, D. Krasauskaitė, S. Stech, and R.S. Ašoklis. 2013. Age-related changes in corneal thickness and endothelial characteristics. *Clin Interv Aging*. 8:1445–1450. doi:10.2147/CIA.S51693.
 - Gao, Y., J.B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng, and Y. Zheng. 2004. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:7618–7623. doi:10.1073/pnas.0307512101.

- García-Mata, R., and K. Burridge. 2007. Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol.* 17:36–43. doi:10.1016/j.tcb.2006.11.004.
- Geroski, D.H., and A. Hadley. 1992. Characterization of corneal endothelium cell cultured on microporous membrane filters. *Curr Eye Res.* 11:61–72.
- Giannotta, M., M. Trani, and E. Dejana. 2013. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev. Cell.* 26:441–454. doi:10.1016/j.devcel.2013.08.020.
- Gillette, T.E., J.W. Chandler, and J.V. Greiner. 1982. Langerhans cells of the ocular surface. *OPHTHA.* 89:700–711.
- Glotfelty, L.G., A. Zahs, C. Iancu, L. Shen, and G.A. Hecht. 2014. Microtubules are required for efficient epithelial tight junction homeostasis and restoration. *AJP: Cell Physiology.* 307:C245–54. doi:10.1152/ajpcell.00336.2013.
- Goeckeler, Z.M., R.A. Masaracchia, Q. Zeng, T.L. Chew, P. Gallagher, and R.B. Wysolmerski. 2000. Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J. Biol. Chem.* 275:18366–18374. doi:10.1074/jbc.M001339200.
- Gomes, P., S.P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens. 2006. Gap junctional intercellular communication in bovine corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research.* 83:1225–1237. doi:10.1016/j.exer.2006.06.012.
- Gomez, G.A., R.W. McLachlan, and A.S. Yap. 2011. Productive tension: force-sensing and homeostasis of cell-cell junctions. *Trends Cell Biol.* 21:499–505. doi:10.1016/j.tcb.2011.05.006.
- Gonzalez Mariscal, L. 2003. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 81:1–44. doi:10.1016/S0079-6107(02)00037-8.
- Gordon, S.R., E. Essner, and H. Rothstein. 1982. In situ demonstration of actin in normal and injured ocular tissues using 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole phalloidin. *Cell Motil.* 2:343–354.
- Gottsch, J.D., C.H. Chen, J.B. Aguayo, J.P. Cousins, E.R. Strahlman, and W.J. Stark. 1986. Glycolytic activity in the human cornea monitored with nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Arch. Ophthalmol.* 104:886–889.
- Green, K.J., and C.L. Simpson. 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest. Dermatol.* 127:2499–2515. doi:10.1038/sj.jid.5701015.
- Grikscheit, K., and R. Grosse. 2016. Formins at the Junction. *Trends Biochem. Sci.* 41:148–159. doi:10.1016/j.tibs.2015.12.002.

- Gröger, N., Fröhlich, H., Maier, H., Olbrich A., Kostin, S., Braun, T., Boettger, T. 2010. SLC4A11 Prevents Osmotic Imbalance Leading to Corneal Endothelial Dystrophy, Deafness, and Polyuria. *J. Biol. Chem.* 285:14467. doi:10.1074/jbc.M109.094680.
- Güell JL, El Hussein MA, Manero F, Gris O, Elies D. 2014. Historical Review and Update of Surgical Treatment for Corneal Endothelial Diseases. *Ophthalmol Ther.* 2014 Dec;3(1-2):1-15. doi: 10.1007/s40123-014-0022-y. Epub 2014 Feb 18.
- Hall, A. 2012. Rho family GTPases. *Biochem. Soc. Trans.* 40:1378–1382. doi:10.1042/BST20120103.
- Hardin, C., K. Rajendran, G. Manomohan, D.T. Tambe, J.P. Butler, J.J. Fredberg, R. Martinelli, C.V. Carman, and R. Krishnan. 2013. Glassy Dynamics, Cell Mechanics, and Endothelial Permeability. *J. Phys. Chem. B.* 117:12850–12856. doi:10.1021/jp4020965.
- Hashemian, M.N., S. Moghimi, M.A. Fard, M.R. Falloh, and M.R. Mansouri. 2006. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Iranian eyes. *BMC Ophthalmol.* 6:9. doi:10.1186/1471-2415-6-9.
- Hassell, J.R., and D.E. Birk. 2010. The molecular basis of corneal transparency. *Experimental Eye Research.* 91:326–335. doi:10.1016/j.exer.2010.06.021.
- Hayashi, K., M. Yoshida, S.-I. Manabe, and A. Hirata. 2011. Cataract surgery in eyes with low corneal endothelial cell density. *Journal of Cataract & Refractive Surgery.* 37:1419–1425. doi:10.1016/j.jcrs.2011.02.025.
- Heiska, L., K. Alfthan, M. Grönholm, P. Vilja, A. Vaheri, and O. Carpen. 1998. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273:21893–21900.
- Heissler, S.M., and D.J. Manstein. 2013. Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cell. Mol. Life Sci.* 70:1–21. doi:10.1007/s00018-012-1002-9.
- Helwani, F.M., E.M. Kovacs, A.D. Paterson, S. Verma, R.G. Ali, A.S. Fanning, S.A. Weed, and A.S. Yap. 2004. Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J. Cell Biol.* 164:899–910. doi:10.1083/jcb.200309034.
- Higa, A., H. Sakai, S. Sawaguchi, A. Iwase, A. Tomidokoro, S. Amano, and M. Araie. 2011. Prevalence of and Risk Factors for Cornea Guttata in a Population-Based Study in a Southwestern Island of Japan: The Kumejima Study. *Arch. Ophthalmol.* 129:332–336. doi:10.1001/archophthalmol.2010.372.

- Hirst, L.W., H.A. Quigley, W.J. Stark, and M.B. Shields. 1980. Specular microscopy of iridocorneal endothelia syndrome. *AJOPHT*. 89:11–21.
- Hodson, S. 1974. The regulation of corneal hydration by a salt pump requiring the presence of sodium and bicarbonate ions. *The Journal of Physiology*. 236:271–302.
- Holden, B.A., D.F. Sweeney, A. Vannas, K.T. Nilsson, and N. Efron. 1985. Effects of long-term extended contact lens wear on the human cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 26:1489–1501.
- Hopkins, A.M., S.V. Walsh, P. Verkade, P. Boquet, and A. Nusrat. 2003. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J. Cell. Sci.* 116:725–742.
- House, C.R. 1974. Water transport in cells and tissues. E. Arnold.
- Hussain, N.K., S. Jenna, M. Glogauer, C.C. Quinn, S. Wasiak, M. Guipponi, S.E. Antonarakis, B.K. Kay, T.P. Stossel, N. Lamarche-Vane, and P.S. McPherson. 2001. Endocytic protein intersectin-I regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol.* 3:927–932. doi:10.1038/ncb1001-927.
- Ichijima, H., W.M. Petroll, P.A. Barry, P.M. Andrews, M. Dai, H.D. Cavanagh, and J.V. Jester. 1993. Actin filament organization during endothelial wound healing in the rabbit cornea: comparison between transcorneal freeze and mechanical scrape injuries. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 34:2803–2812.
- Iden, S., and J.G. Collard. 2008. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:846–859. doi:10.1038/nrm2521.
- Ing, J.J., H.H. Ing, L.R. Nelson, D.O. Hodge, and W.M. Bourne. 1998. Ten-year postoperative results of penetrating keratoplasty. *OPHTHA*. 105:1855–1865. doi:10.1016/S0161-6420(98)91030-2.
- Ishizaki, T., M. Uehata, I. Tamechika, J. Keel, K. Nonomura, M. Maekawa, and S. Narumiya. 2000. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol. Pharmacol.* 57:976–983.
- Ivanov, A.I. 2008. Actin motors that drive formation and disassembly of epithelial apical junctions. *Front. Biosci.* 13:6662–6681.
- Ivanov, A.I., D. Hunt, M. Utech, A. Nusrat, and C.A. Parkos. 2005. Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol. Biol. Cell.* 16:2636–2650. doi:10.1091/mbc.E05-01-0043.

- Ivetic, A., and A.J. Ridley. 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology*. 112:165–176. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01882.x.
- Jalimarada, S.S., M. Shivanna, V. Kini, D. Mehta, and S.P. Srinivas. 2009. Microtubule disassembly breaks down the barrier integrity of corneal endothelium. *Experimental Eye Research*. 89:333–343. doi:10.1016/j.exer.2009.03.019.
- Johnson, J.L., N.A. Najor, and K.J. Green. 2014. Desmosomes: regulators of cellular signaling and adhesion in epidermal health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 4:a015297. doi:10.1101/cshperspect.a015297.
- Johnston, D.S., and B. Sanson. 2011. Epithelial polarity and morphogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*
- Joyce, N.C., Harris, D.L., Zieske, J.D., 1998. Mitotic inhibition of corneal endothelium in neonatal rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2572e2583.
- Joyce, N.C. 2012. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research*. 95:16–23. doi:10.1016/j.exer.2011.08.014.
- Joyce, N.C., and C.C. Zhu. 2004. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea*. 23:S8–S19.
- Jumblatt, M.M. 1981. Intracellular potentials of cultured rabbit corneal endothelial cells: response to temperature and ouabain. *Vision Res.* 21:45–47.
- Jurkunas, U.V., Bitar, M.S., Funaki, T. and Azizi. B. 2010. Evidence of oxidative stress in the pathogenesis of fuchs endothelial corneal dystrophy. *Am. J. Pathol.* 177:2278–2289. doi:10.2353/ajpath.2010.100279.
- Jurkunas, U., Kazalaukas, A., Dana, R., Fuchsluger, T.A., 2011. Anti-Apoptotic Gene Therapy Prolongs Survival of Corneal Endothelial Cells during Storage. *Gene Ther.* 18:778–787. doi:10.1038/gt.2011.20.
- Kabosova, A., D.T. Azar, G.A. Bannikov, K.P. Campbell, M. Durbееj, R.F. Ghohestani, J.C.R. Jones, M.C. Kenney, M. Koch, Y. Ninomiya, B.L. Patton, M. Paulsson, Y. Sado, E.H. Sage, T. Sasaki, L.M. Sorokin, M.-F. Steiner-Champlaud, T.-T. Sun, N. Sundarraj, R. Timpl, I. Virtanen, and A.V. Ljubimov. 2007. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 48:4989–4999. doi:10.1167/iovs.07-0654.
- Kamm, K.E., and J.T. Stull. 2001. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J. Biol. Chem.* 276:4527–4530. doi:10.1074/jbc.R000028200.

- Kanis, A.B., A.A. Al-Rajhi, C.M. Taylor, W.D. Mathers, R.Y. Folberg, D.Y. Nishimura, V.C. Sheffield, and E.M. Stone. 1999. Exclusion of AR-CHED from the chromosome 20 region containing the PPMD and AD-CHED loci. *Ophthalmic Genet.* 20:243–249.
- Kapoor, R., L.Y. Sakai, S. Funk, E. Roux, P. Bornstein, and E.H. Sage. 1988. Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices. *J. Cell Biol.* 107:721–730.
- Katsube, T., M. Takahisa, R. Ueda, N. Hashimoto, M. Kobayashi, and S. Togashi. 1998. Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse. *J. Biol. Chem.* 273:29672–29677.
- Kevin L Schey, Z.W.J.L.W.Y.Q. 2014. Aquaporins in the eye: Expression, function, and roles in ocular disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840:1513. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.037.
- Kim, E.K., D.H. Geroski, G.P. Holley, S.I. Urken, and H.F. Edelhauser. 1992. Corneal endothelial cytoskeletal changes in F-actin with aging, diabetes, and after cytochalasin exposure. *AJOPHT.* 114:329–335.
- Koch, S., and A. Nusrat. 2009. Dynamic regulation of epithelial cell fate and barrier function by intercellular junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165:220–227. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04025.x.
- Kouklis, P., M. Konstantoulaki, S. Vogel, M. Broman, and A.B. Malik. 2004. Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circulation Research.* 94:159–166. doi:10.1161/01.RES.0000110418.38500.31.
- Krachmer, J.H. 1985. Posterior polymorphous corneal dystrophy: a disease characterized by epithelial-like endothelial cells which influence management and prognosis. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 83:413–475.
- Kraemer, A., Goodwin, M., Verma, S., Yap, A.S., and Ali, R. G. (2007). Rac is a dominant regulator of cadherin-directed actin assembly that is activated by adhesive ligation independently of Tiam1., *Am J Physiol Cell Physiol* 292(3), C1061–9. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00073.2006>
- Kramer, T.R., H.E. Grossniklaus, N. Vigneswaran, G.O. Waring, and A. Kozarsky. 1992. Cytokeratin expression in corneal endothelium in the iridocorneal endothelial syndrome. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 33:3581–3585.
- Kunda, P., A.E. Pelling, T. Liu, and B. Baum. 2008. Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. *Curr. Biol.* 18:91–101. doi: 10.1016/j.cub.2007.12.051.

- Kupfer, C., M.I. Kaiser-Kupfer, M. Datiles, and L. McCain. 1983. The contralateral eye in the iridocorneal endothelial (ICE) syndrome. *OPHTHA*. 90:1343–1350.
- Lam, F.C., M.Q. Rahman, and K. Ramaesh. 2007. Traumatic wound dehiscence after penetrating keratoplasty-a cause for concern. *Eye (Lond)*. 21:1146–1150. doi:10.1038/sj.eye.6702407.
- Lawrence, D.W., K.M. Comerford, and S.P. Colgan. 2002. Role of VASP in reestablishment of epithelial tight junction assembly after Ca²⁺ switch. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 282:C1235–45. doi:10.1152/ajpcell.00288.2001.
- Lee MD, W.B., B.E. Lusk MD, and M.J. Lynn MS. 2012. A Prospective, Randomized Trial of DSAEK Outcomes Comparing Different Donor Preparation Devices. *Int J Eye Bank*. 1. doi:10.7706/ijeb.v1i1.23.
- Lee, T.-Y.J., and A.I. Gotlieb. 2003. Microfilaments and microtubules maintain endothelial integrity. *Microsc. Res. Tech.* 60:115–127. doi:10.1002/jemt.10250.
- Lee, W.B., E. Meinecke, and B. Varnum. 2013. The evolution of eye banking and corneal transplantation: a symbiotic relationship. *Int Ophthalmol Clin*. 53:115–129. doi:10.1097/IIO.0b013e31827823c5.
- Leerberg, J.M., G.A. Gomez, S. Verma, E.J. Moussa, S.K. Wu, R. Priya, B.D. Hoffman, C. Grashoff, M.A. Schwartz, and A.S. Yap. 2014. Tension-sensitive actin assembly supports contractility at the epithelial zonula adherens. *Curr. Biol*. 24:1689–1699. doi:10.1016/j.cub.2014.06.028.
- Levis, H.J., G.S.L. Peh, K.-P. Toh, R. Poh, A.J. Shortt, R.A.L. Drake, J.S. Mehta, and J.T. Daniels. 2012. Plastic compressed collagen as a novel carrier for expanded human corneal endothelial cells for transplantation. *PLoS ONE*. 7:e50993. doi:10.1371/journal.pone.0050993.
- Liu, K.C., and R.E. Cheney. 2012. Myosins in cell junctions. *Bioarchitecture*. 2:158–170. doi:10.4161/bioa.21791.
- Louvet-Vallée, S. 2000. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol. Cell*. 92:305–316.
- Luo, W., C.-H. Yu, Z.Z. Lieu, J. Allard, A. Mogilner, M.P. Sheetz, and A.D. Bershadsky. 2013. Analysis of the local organization and dynamics of cellular actin networks. *J. Cell Biol*. 202:1057–1073. doi:10.1083/jcb.201210123.
- Ma, L., K. Kuang, R.W. Smith, D. Rittenband, P. Iserovich, F.P.J. Diecke, and J. Fischbarg. 2007. Modulation of tight junction properties relevant to fluid transport across rabbit corneal endothelium. *Experimental Eye Research*. 84:790–798. doi:10.1016/j.exer.2006.12.018.

- Mack, N.A., A.P. Porter, H.J. Whalley, J.P. Schwarz, R.C. Jones, A.S.S. Khaja, A. Bjartell, K.I. Anderson, and A. Malliri. 2012. β 2-syntrophin and Par-3 promote an apicobasal Rac activity gradient at cell-cell junctions by differentially regulating Tiam1 activity. *Nat Cell Biol.* 14:1169–1180. doi:10.1038/ncb2608.
- Madara, J.L., R. Moore, and S. Carlson. 1987. Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. *Am. J. Physiol.* 253:C854–61.
- Man, S., E.E. Ubogu, K.A. Williams, B. Tucky, M.K. Callahan, and R.M. Ransohoff. 2008. Human Brain Microvascular Endothelial Cells and Umbilical Vein Endothelial Cells Differentially Facilitate Leukocyte Recruitment and Utilize Chemokines for T Cell Migration. *Clinical and Developmental Immunology.* 2008:1–8. doi:10.1152/ajpcell.00172.2004.
- Mangeat, P., C. Roy, and M. Martin. 1999. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol.* 9:187–192.
- Mannis, M.J., K. Zadnik, M.R. Miller, and M. Marquez. 1997. Preoperative risk factors for surface disease after penetrating keratoplasty. *Cornea.* 16:7–11.
- Marcos-Ramiro, B., D. García-Weber, and J. Millán. 2014. TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. *Thromb Haemost.* 112:1088–1102. doi:10.1160/TH14-04-0299.
- Marcos-Ramiro, B., D. García-Weber, S. Barroso, J. Feito, M.C. Ortega, E. Cernuda-Morollón, N. Reglero-Real, L. Fernandez-Martin, M.C. Durán, M.A. Alonso, I. Correas, S. Cox, A.J. Ridley, and J. Millán. 2016a. RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J. Cell Biol.* 213:385–402. doi:10.1083/jcb.201504038.dv.
- Marcos-Ramiro, B., D. García-Weber, S. Barroso, J. Feito, M.C. Ortega, E. Cernuda-Morollón, N. Reglero-Real, L. Fernandez-Martin, M.C. Durán, M.A. Alonso, I. Correas, S. Cox, A.J. Ridley, and J. Millán. 2016b. RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J. Cell Biol.* 213:385–402. doi:10.1083/jcb.201504038.
- Marfurt, C.F., M.A. Jones, and K. Thrasher. 1998. Parasympathetic innervation of the rat cornea. *Experimental Eye Research.* 66:437–448. doi:10.1006/exer.1997.0445.
- Marfurt, C.F., R.E. Kingsley, and S.E. Echtenkamp. 1989. Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 30:461–472.
- Marmor, M.F. 1979. Retinal detachment from hyperosmotic intravitreal injection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 18:1237–1244.

- Martin, A.C., M. Kaschube, and E.F. Wieschaus. 2009. Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature*. 457:495–499. doi:10.1038/nature07522.
- Martin, A.C. 2010. Pulsation and stabilization: contractile forces that underlie morphogenesis. *Developmental Biology*, vol. 341 (1) pp. 114-125
- Matsui, T., M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1998. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell Biol.* 140:647–657.
- Matsui, T., S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1999. Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr. Biol.* 9:1259–1262.
- Matsumura, F., G. Totsukawa, Y. Yamakita, and S. Yamashiro. 2001. Role of myosin light chain phosphorylation in the regulation of cytokinesis. *Cell Struct. Funct.* 26:639–644.
- Maurice, D.M. 1951. The permeability to sodium ions of the living rabbit's cornea. *The Journal of Physiology*. 112:367–391.
- Maurice, D.M. 1984. The cornea and sclera. *The eye*.
- Maurice, D.M., and S.P. Srinivas. 1994. Fluorometric measurement of light absorption by the rabbit cornea. *Experimental Eye Research*. 58:409–413. doi:10.1006/exer.1994.1033.
- McCartney, A.C., and C.M. Kirkness. 1988. Comparison between posterior polymorphous dystrophy and congenital hereditary endothelial dystrophy of the cornea. *Eye (Lond)*. 2 (Pt 1):63–70. doi:10.1038/eye.1988.14.
- Mehta, D., and A.B. Malik. 2006. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* 86:279–367. doi:10.1152/physrev.00012.2005.
- Mencucci, R., C. Ponchietti, G. Virgili, F. Giansanti, and U. Menchini. 2006. Corneal endothelial damage after cataract surgery: Microincision versus standard technique. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 32:1351–1354. doi:10.1016/j.jcrs.2006.02.070.
- Mergler, S., and U. Pleyer. 2007. The human corneal endothelium: new insights into electrophysiology and ion channels. *Prog Retin Eye Res.* 26:359–378. doi:10.1016/j.preteyeres.2007.02.001.
- Michel, C.C., and F.E. Curry. 1999. Microvascular permeability. *Physiol. Rev.* 79:703–761.

- Millán, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., and Ridley, A.J. 2006. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol.* 8:113–123. doi:10.1038/ncb1356.
- Millán, J., Cain, R.J., Reglero-Real, N., Bigarella, C., Marcos-Ramiro, B., Fernandez-Martin, L., Correas, I. and Ridley, A.J. 2010. Adherens junctions connect stress fibers between adjacent endothelial cells. *BMC Biol.* 8:11. doi:10.1186/1741-7007-8-11.
- Mimura, T., and N.C. Joyce. 2006. Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 47:1387–1396. doi:10.1167/iovs.05-1199.
- Miyanaga, M., S. Sugita, N. Shimizu, T. Morio, K. Miyata, K. Maruyama, S. Kinoshita, and M. Mochizuki. 2010. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br J Ophthalmol.* 94:336–340. doi:10.1136/bjo.2008.156422.
- Montalvo-Ortiz, B.L., L. Castillo-Pichardo, E. Hernandez, T. Humphries-Bickley, A. De La Mota-Peynado, L.A. Cubano, C.P. Vlaar, and S. Dharmawardhane. 2012. Characterization of EHop-016, Novel Small Molecule Inhibitor of Rac GTPase. *Journal of Biological Chemistry.* 287:13228–13238. doi:10.1074/jbc.M111.334524.
- Morgan, C., W.C. DeGroat, and P.J. Jannetta. 1987. Sympathetic innervation of the cornea from the superior cervical ganglion. An HRP study in the cat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 20:179–183.
- Mustonen, R.K., M.B. McDonald, S. Srivannaboon, A.L. Tan, M.W. Doubrava, and C.K. Kim. 1998. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea.* 17:485–492.
- Müller, L. 2003. Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental Eye Research.* 76:521–542. doi:10.1016/S0014-4835(03)00050-2.
- Müller, L.J., G.F. Vrensen, L. Pels, and B.N. Cardozo. 1997. Architecture of human corneal nerves. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 38:985–994.
- Nakahara, M., N. Okumura, E.P. Kay, M. Hagiya, K. Imagawa, Y. Hosoda, S. Kinoshita, and N. Koizumi. 2013. Corneal endothelial expansion promoted by human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium. *PLoS ONE.* 8:e69009. doi:10.1371/journal.pone.0069009.

- Nanavaty, M.A., X. Wang, and A.J. Shortt. 2014. Endothelial keratoplasty versus penetrating keratoplasty for Fuchs endothelial dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2:CD008420. doi:10.1002/14651858.CD008420.pub3.
- Naor, J., N. Savion, M. Blumenthal, and E.I. Assia. 2001. Corneal endothelial cytotoxicity of diluted povidone--iodine. *Journal of Cartaract & Refractive Surgery.* 27:941–947.
- Narumiya, S., N. Watanabe, T. Kato, A. Fujita, and T. Ishizaki. 1999. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. - PubMed - NCBI. *Nat Cell Biol.* 1:136–143. doi:10.1038/11056.
- Netto, M.V., R.R. Mohan, R. Ambrósio, A.E.K. Hutcheon, J.D. Zieske, and S.E. Wilson. 2005. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea.* 24:509–522.
- Ngok, S.P., and P.Z. Anastasiadis. 2013. Rho GEFs in endothelial junctions: Effector selectivity and signaling integration determine junctional response. *Tissue Barriers.* 1:e27132. doi:10.4161/tisb.27132.
- Nishiuchi, R., J. Takagi, M. Hayashi, H. Ido, Y. Yagi, N. Sanzen, T. Tsuji, M. Yamada, and K. Sekiguchi. 2006. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. *Matrix Biol.* 25:189–197. doi:10.1016/j.matbio.2005.12.001.
- Noren, N.K., C.M. Niessen, B.M. Gumbiner, and K. Burridge. 2001. Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J. Biol. Chem.* 276:33305–33308. doi: 10.1074/jbc.C100306200.
- Noske, W., M. Fromm, B. Levarlet, K.M. Kreusel, and M. Hirsch. 1994. Tight junctions of the human corneal endothelium: morphological and electrophysiological features. *Ger J Ophthalmol.* 3:253–257.
- Nusrat, A., J.R. Turner, and J.L. Madara. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279:G851–7.
- Nusrat, A., M. Giry, J.R. Turner, S.P. Colgan, C.A. Parkos, D. Carnes, E. Lemichez, P. Boquet, and J.L. Madara. 1995. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:10629–10633.
- Obata, H., and T. Tsuru. 2007. Corneal wound healing from the perspective of keratoplasty specimens with special reference to the function of the Bowman

layer and Descemet membrane. *Cornea*. 26:S82–9. doi:10.1097/ICO.0b013e31812f6f1b.

- Okamura, D., M. Ohtsuka, F. Kimura, H. Shimizu, H. Yoshidome, A. Kato, and M. Miyazaki. 2008. Ezrin expression is associated with hepatocellular carcinoma possibly derived from progenitor cells and early recurrence after surgical resection. *Mod. Pathol.* 21:847–855. doi:10.1038/modpathol.2008.59.
- Okumura, N., E.P. Kay, M. Nakahara, J. Hamuro, S. Kinoshita, and N. Koizumi. 2013. Inhibition of TGF- β signaling enables human corneal endothelial cell expansion in vitro for use in regenerative medicine. *PLoS ONE*. 8:e58000. doi:10.1371/journal.pone.0058000.
- Orian-Rousseau, V., L. Chen, J.P. Sleeman, P. Herrlich, and H. Ponta. 2002. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev.* 16:3074–3086. doi:10.1101/gad.242602.
- Padilla, M.D.B., S.A.B. Sibayan, and C.S.A. Gonzales. 2004. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Filipino eyes. *Cornea*. 23:129–135.
- Pai, S.-Y., C. Kim, and D.A. Williams. 2010. Rac GTPases in human diseases. *Dis. Markers*. 29:177–187. doi:10.3233/DMA-2010-0738.
- Patel, S.V., D.O. Hodge, and W.M. Bourne. 2005. Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. *AJOPHT*. 139:311–319. doi:10.1016/j.ajo.2004.09.045.
- Patel, S.V., N.N. Diehl, D.O. Hodge, and W.M. Bourne. 2010. Donor risk factors for graft failure in a 20-year study of penetrating keratoplasty. *Arch. Ophthalmol.* 128:418–425. doi:10.1001/archophthalmol.2010.27.
- Patil, S.B., and K.N. Bitar. 2006. RhoA- and PKC-alpha-mediated phosphorylation of MYPT and its association with HSP27 in colonic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290:G83–95. doi:10.1152/ajpgi.00178.2005.
- Patterson, C.E., H. Lum, K.L. Schaphorst, A.D. Verin, and G.J. G. 2000. Regulation of endothelial barrier function by the cAMP-dependent protein kinase. *Endothelium*. 7:287–308.
- Peh, G.S.L., K.-P. Toh, F.-Y. Wu, D.T. Tan, and J.S. Mehta. 2011a. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS ONE*. 6:e28310. doi:10.1371/journal.pone.0028310.
- Peh, G.S.L., R.W. Beuerman, A. Colman, D.T. Tan, and J.S. Mehta. 2011b. Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: an overview. *Transplantation*. 91:811–819. doi:10.1097/TP.0b013e3182111f01.

- Pflugfelder, S.C., D. Jones, Z. Ji, A. Afonso, and D. Monroy. 1999. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res.* 19:201–211.
- Park, C.Y., Lee, J.K., Gore, P.K., RN, Lim, C.-Y., and Chuck R.S., 2015. Keratoplasty in the United States. *Ophtha.* 1–11. doi:10.1016/j.opthta.2015.08.017.
- Pillai, C.T., H.S. Dua, A. Azuara-Blanco, and A.R. Sarhan. 2000. Evaluation of corneal endothelium and keratic precipitates by specular microscopy in anterior uveitis. *British Journal of Ophthalmology.* 84:1367–1371.
- Polse, K.A., R.J. Brand, S.R. Cohen, and M. Guillon. 1990. Hypoxic effects on corneal morphology and function. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 31:1542–1554.
- Price, F.W., W.E. Whitson, K.A. Ahad, and H. Tavakkoli. 1994. Suprachoroidal hemorrhage in penetrating keratoplasty. *Ophthalmic Surg.* 25:521–525.
- Prudnikova, T.Y., S.J. Rawat, and J. Chernoff. 2015. Molecular pathways: targeting the kinase effectors of RHO-family GTPases. *Clin. Cancer Res.* 21:24–29. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0827.
- Quiros, M., L. Alarcón, A. Ponce, T. Giannakouros, and L. González-Mariscal. 2013. The intracellular fate of zonula occludens 2 is regulated by the phosphorylation of SR repeats and the phosphorylation/O-GlcNAcylation of S257. *Mol. Biol. Cell.* 24:2528–2543. doi:10.1091/mbc.E13-04-0224.
- Ramachandran, C., and S.P. Srinivas. 2010. Formation and disassembly of adherens and tight junctions in the corneal endothelium: regulation by actomyosin contraction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 51:2139–2148. doi:10.1167/iops.09-4421.
- Rao, S.K., P. Ranjan Sen, R. Fogla, S. Gangadharan, P. Padmanabhan, and S.S. Badrinath. 2000. Corneal endothelial cell density and morphology in normal Indian eyes. *Cornea.* 19:820–823.
- Reinhard, T., and F. Larkin. 2007. Cornea and External Eye Disease. Springer Science & Business Media. 1 pp.
- Ren, X.D., and M.A. Schwartz. 2000. Determination of GTP loading on Rho. *Meth. Enzymol.* 325:264–272.
- Reymann, A.-C., R. Boujemaa-Paterski, J.-L. Martiel, C. Guérin, W. Cao, H.F. Chin, E.M. De La Cruz, M. Théry, and L. Blanchoin. 2012. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science.* 336:1310–1314. doi:10.1126/science.1221708.

-
- Riddle, H.K., D.A. Parker, and F.W. Price. 1998. Management of postkeratoplasty astigmatism. *Current Opinion in Ophthalmology*. 9:15–28.
 - Ridley, A.J. 2001. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11:471–477.
 - Rozsa, A.J., Beuerman, R.W. 1982. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain* 14:105-120.
 - Ruiz- Saenz, A. Kremer, L., Alonso, M.A., Millan, J., Correas, I. 2011. Protein 4.1R regulates cell migration and IQGAP1 recruitment to the leading edge. *Journal of cell science*. Vol 124 (pt15) pp. 2529-2538.
 - S Amer Riazuddin, S.V.N.K.J.D.G. 2013. Mutations in AGBL1 Cause Dominant Late-Onset Fuchs Corneal Dystrophy and Alter Protein-Protein Interaction with TCF4. *American Journal of Human Genetics*. 93:758–764. doi:10.1016/j.ajhg.2013.08.010.
 - Sack, R.A., I. Nunes, A. Beaton, and C. Morris. 2001. Host-Defense Mechanism of the Ocular Surfaces. *Bioscience Reports*. 21:463–480. doi:10.1023/A:1017943826684.
 - Sahai, E., and C.J. Marshall. 2002. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol.* 4:408–415. doi:10.1038/ncb796.
 - Sanchis-Gimeno, J.A., A. Lleó, L. Alonso, M.S. Rahhal, and F. Martínez-Soriano. 2003. Differences in corneal anatomy in a pair of monozygotic twins due to continuous contact lens wear. *Cornea*. 22:243–245.
 - Santander-García, D., Ortega M.C., Benito, S., Barroso, S., Jiménez-Alfaro, I., Millán, J. 2016. A human cellular system for analyzing signaling during corneal endothelial barrier dysfunction. *Experimental Eye Research*, 153 (2016) 8-13. doi:10.1016/j.exer.2016.09.010
 - Satpathy, M., P. Gallagher, M. Lizotte-Waniewski, and S.P. Srinivas. 2004. Thrombin-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II in cultured bovine corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research*. 79:477–486. doi: 10.1016/j.exer.2004.06.018.
 - Satpathy, M., P. Gallagher, Y. Jin, and S.P. Srinivas. 2005. Extracellular ATP opposes thrombin-induced myosin light chain phosphorylation and loss of barrier integrity in corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research*. 81:183–192. doi: 10.1016/j.exer.2005.01.026.

- Schaeffer, A.J. 1950. Osmotic pressure of the extraocular and intraocular fluids. *Arch Ophthalmol.* 43:1026–1035.
- Schiff, P.B., J. Fant, and S.B. Horwitz. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature.* 1979 Feb 22; 277(5698):665–667.
- Schwarz, J., J. Proff, A. Hävemeier, M. Ladwein, K. Rottner, B. Barlag, A. Pich, H. Tatge, I. Just, and R. Gerhard. 2012. Serine-71 phosphorylation of Rac1 modulates downstream signaling. *PLoS ONE.* 7:e44358. doi:10.1371/journal.pone.0044358.
- Sechi, A.S., and J. Wehland. 2000. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 21:3685–3695.
- Sellers, J.R. 1991. Regulation of cytoplasmic and smooth muscle myosin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:98–104.
- Shao, X., Q. Li, A. Mogilner, A.D. Bershadsky, and G.V. Shivashankar. 2015. Mechanical stimulation induces formin-dependent assembly of a perinuclear actin rim. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 112:E2595–601. doi:10.1073/pnas.1504837112.
- Shenoy, R., R. Khandekar, A. Bialasiewicz, and A. Al Muniri. 2009. Corneal endothelium in patients with diabetes mellitus: a historical cohort study. *Eur J Ophthalmol.* 19:369–375.
- Shewan, A.M., M. Maddugoda, A. Kraemer, S.J. Stehbens, S. Verma, E.M. Kovacs, and A.S. Yap. 2005. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol. Biol. Cell.* 16:4531–4542. doi:10.1091/mbc.E05-04-0330.
- Shields, M.B. 1979. Progressive essential iris atrophy, Chandler's syndrome, and the iris nevus (Cogan-Reese) syndrome: a spectrum of disease. *Surv Ophthalmol.* 24:3–20.
- Shivanna, M., G. Rajashekhar, and S.P. Srinivas. 2010. Barrier Dysfunction of the Corneal Endothelium in Response to TNF- α : Role of p38 MAP Kinase. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 51:1575–1582. doi:10.1167/iovs.09-4343.
- Simon, M., P. Fellner, Y. El-Shabrawi, and N. Ardjomand. 2004. Influence of donor storage time on corneal allograft survival. *OPHTHA.* 111:1534–1538. doi: 10.1016/j.ophttha.2003.12.060.
- Soderling, S.H., K.L. Binns, G.A. Wayman, S.M. Davee, S.H. Ong, T. Pawson, and J.D. Scott. 2002. The WRP component of the WAVE-1 complex attenuates Rac-mediated signalling. *Nat Cell Biol.* 4:970–975. doi:10.1038/ncb886.

-
- Somlyo, A.P., and A.V. Somlyo. 2003. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* 83:1325–1358. doi:10.1152/physrev.00023.2003.
 - Spindler, V., N. Schlegel, and J. Waschke. 2010. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovascular Research.* 87:243–253. doi:10.1093/cvr/cvq086.
 - Srinivas, S.P. 2006. Histamine-Induced Phosphorylation of the Regulatory Light Chain of Myosin II Disrupts the Barrier Integrity of Corneal Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 47:4011–4018. doi:10.1167/iovs.05-1127.
 - Srinivas, S.P. 2010. Dynamic Regulation of Barrier Integrity of the Corneal Endothelium. *Optometry and Vision Science.* 1. doi:10.1097/OPX.0b013e3181d39464.
 - Srinivas, S.P. 2012. Cell signaling in regulation of the barrier integrity of the corneal endothelium. *Experimental Eye Research.* 95:8–15. doi:10.1016/j.exer.2011.09.009.
 - Srinivas, S.P., M. Satpathy, P. Gallagher, E. Larivière, and W. Van Driessche. 2004. Adenosine induces dephosphorylation of myosin II regulatory light chain in cultured bovine corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research.* 79:543–551. doi:10.1016/j.exer.2004.06.027.
 - Stefansson, A., O. Müller, and R. Sundmacher. 1982. Non-contact specular microscopy of the normal corneal endothelium. A statistical evaluation of morphometric parameters. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 218:200–205.
 - Stepp, M.A. 2006. Corneal integrins and their functions. *Experimental Eye Research.* 83:3–15. doi:10.1016/j.exer.2006.01.010.
 - Stevens, T., J. Garcia, and D.M. Shasby. 2000. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *American Journal of*
 - Stevenson, B.R., J.D. Siliciano, M.S. Mooseker, and D.A. Goodenough. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* 103:755–766.
 - Suttmüller, M., J.A. Bruijn, and E. de Heer. 1997. Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology. *Histol. Histopathol.* 12:557–566.
 - Tachibana, A., and M. Sawa. 2002. Development of novel corneal storage medium: first report. Examinations of rabbit cornea. *Jpn J Ophthalmol.* 46:377–383.

- Tamura, Y., H. Konomi, H. Sawada, S. Takashima, and A. Nakajima. 1991. Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 32:2636–2644.
- Tanaka, Y., H. Nakanishi, S. Kakunaga, N. Okabe, T. Kawakatsu, K. Shimizu, and Y. Takai. 2003. Role of nectin in formation of E-cadherin-based adherens junctions in keratinocytes: analysis with the N-cadherin dominant negative mutant. *Mol. Biol. Cell*. 14:1597–1609. doi:10.1091/mbc.E02-10-0632.
- Terry, M.A., and P.J. Ousley. 2001. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results. *Cornea*. 20:239–243.
- Terry, S.J., C. Zihni, A. Elbediwy, E. Vitiello, I.V. Leefa Chong San, M.S. Balda, and K. Matter. 2014. Seminars in Cell & Developmental Biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36:194–203. doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.003.
- Tetsumoto, K., T. Kubota, V. Rummelt, L.M. Holbach, and G.O. Naumann. 1993. Epithelial transformation of the corneal endothelium in forceps birth-injury-associated keratopathy. *Cornea*. 12:65–71.
- Thumkeo, D., R. Shinohara, K. Watanabe, H. Takebayashi, Y. Toyoda, K. Tohyama, T. Ishizaki, T. Furuyashiki, and S. Narumiya. 2011. Deficiency of mDia, an actin nucleator, disrupts integrity of neuroepithelium and causes periventricular dysplasia. *PLoS ONE*. 6:e25465. doi:10.1371/journal.pone.0025465.
- Tian, X., Y. Tian, G. Gawlak, F. Meng, Y. Kawasaki, T. Akiyama, and A.A. Birukova. 2015. Asef controls vascular endothelial permeability and barrier recovery in the lung. *Mol. Biol. Cell*. 26:636–650. doi:10.1091/mbc.E14-02-0725.
- Timmerman, I., N. Heemskerk, J. Kroon, A. Schaefer, J. van Rijssel, M. Hoogenboezem, J. van Unen, J. Goedhart, T.W.J. Gadella, T. Yin, Y. Wu, S. Huveneers, and J.D. van Buul. 2015. A local VE-cadherin and Trio-based signaling complex stabilizes endothelial junctions through Rac1. *J. Cell. Sci.* 128:3514. doi:10.1242/jcs.179424.
- Tiruppathi, C., A.B. Malik, P.J. Del Vecchio, C.R. Keese, and I. Giaever. 1992. Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:7919–7923.
- Titushkin, I., S. Sun, A. Paul, and M. Cho. 2013. Control of adipogenesis by ezrin, radixin and moesin-dependent biomechanics remodeling. *Journal of Biomechanics*. 46:521–526. doi:10.1016/j.jbiomech.2012.09.027.
- Turner, J.R. 2000. “Putting the squeeze” on the tight junction: understanding cytoskeletal regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11:301–308. doi:10.1006/scdb.2000.0180.

- Turner, J.R., B.K. Rill, S.L. Carlson, D. Carnes, R. Kerner, R.J. Mersny, and J.L. Madara. 1997. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 273:C1378–85.
- Unbekandt, M., and M.F. Olson. 2014. The actin-myosin regulatory MRCK kinases: regulation, biological functions and associations with human cancer. *J. Mol. Med.* 92:217–225. doi:10.1007/s00109-014-1133-6.
- Urzainqui, A., J.M. Serrador, F. Viedma, M. Yanez-Mo, A. Rodríguez, A.L. Corbí, J.L. Alonso-Lebrero, A. Luque, M. Deckert, J. Vázquez, and F. Sanchez-Madrid. 2002. ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity.* 17:401–412.
- Valtink, M., R. Gruschwitz, R.H.W. Funk, and K. Engelmann. 2008. Two Clonal Cell Lines of Immortalized Human Corneal Endothelial Cells Show either Differentiated or Precursor Cell Characteristics. *Cells Tissues Organs.* 187:286–294. doi: 10.1159/000113406.
- Van Buul, J.D., and I. Timmerman. 2015. Small Rho GTPase-mediated actin dynamics at endothelial adherens junctions. *Small GTPases.* 7:21–31. doi: 10.1080/21541248.2015.1131802.
- Van Horn, D.L., and R.O. Schultz. 1974. Endothelial survival in cryopreserved human corneas: a scanning electron microscopic study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* vol. 13 (1) pp. 7-16
- Van Nieuw Amerongen, G.P., and V.W. van Hinsbergh. 2001. Cytoskeletal effects of rho-like small guanine nucleotide-binding proteins in the vascular system. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 21:300–311.
- Van Nieuw Amerongen, G.P., and V.W.M. van Hinsbergh. 2007. Endogenous RhoA inhibitor protects endothelial barrier. *Circulation Research.* 101:7–9. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.156513.
- Van Nieuw Amerongen, G.P., R. Draijer, M.A. Vermeer, and V.W. van Hinsbergh. 1998. Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA. *Circulation Research.* 83:1115–1123.
- Van Rijssel, J., Van Buul, J.D. 2012. The many faces of the guanine-nucleotide exchange factor trio. *Cell adhesion and migration.* Vol 6 (6) pp. 482-487.
- Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R.S. Adelstein, and A.R. Horwitz. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:778–790. doi:10.1038/nrm2786.

- Wallace, S.W., J. Durgan, D. Jin, and A. Hall. 2010. Cdc42 regulates apical junction formation in human bronchial epithelial cells through PAK4 and Par6B. *Mol. Biol. Cell.* 21:2996–3006. doi:10.1091/mbc.E10-05-0429.
- Waschke, J. 2004. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *AJP: Heart and Circulatory Physiology.* 288:H1296–H1305. doi: 10.1152/ajpheart.00687.2004.
- Watsky, M.A., M.L. McDermott, and H.F. Edelhauser. 1989. In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: the effects of age, cataract surgery and diabetes. *Experimental Eye Research.* 49:751–767.
- Watsky, M.A., Z. Guan, and D.N. Ragsdale. 1996. Effect of tumor necrosis factor alpha on rabbit corneal endothelial permeability. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 37:1924–1929.
- Weiss, J.S., H.U. Møller, W. Lisch, S. Kinoshita, A.J. Aldave, M.W. Belin, T. Kivelä, M. Busin, F.L. Munier, B. Seitz, J. Sutphin, C. Bredrup, M.J. Mannis, C.J. Rapuano, G. Van Rij, E.K. Kim, and G.K. Klintworth. 2008. The IC3D classification of the corneal dystrophies. *Cornea.* 27 Suppl 2:S1–83. doi:10.1097/ICO.0b013e31817780fb.
- Weissman, B.A., I. Fatt, and J. Rasson. 1981. Diffusion of oxygen in human corneas in vivo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 20:123–125.
- Wheeler, A., and A. Ridley. 2004. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Experimental Cell Research.* 301:43–49. doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.012.
- Wiffen, S.J., D.O. Hodge, and W.M. Bourne. 2000. The Effect of Contact Lens Wear on the Central and Peripheral Corneal Endothelium. *Cornea.* 19:47–51.
- Wiley, L., N. SundarRaj, T.T. Sun, and R.A. Thoft. 1991. Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 32:594–602.
- Wilson, S.E., and J.W. Hong. 2000. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea.* 19:417–420.
- Wilson, S.E., Q. Liang, and W.J. Kim. 1999. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 40:2185–2190.
- Wilson, S.E., W.M. Bourne, and R.F. Brubaker. 1988. Effect of dexamethasone on corneal endothelial function in Fuchs' dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 29:357–361.

- Wilson, S.E., Y.G. He, J. Weng, Q. Li, A.W. McDowall, M. Vital, and E.L. Chwang. 1996. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Experimental Eye Research*. 62:325–327. doi:10.1006/exer.1996.0038.
- Wu, S.K., G.A. Gomez, M. Michael, S. Verma, H.L. Cox, J.G. Lefevre, R.G. Parton, N.A. Hamilton, Z. Neufeld, and A.S. Yap. 2014. Cortical F-actin stabilization generates apical-lateral patterns of junctional contractility that integrate cells into epithelia. *Nat Cell Biol*. 16:167–178. doi:10.1038/ncb2900.
- Yamagami, S., S. Yokoo, T. Mimura, T. Takato, M. Araie, and S. Amano. 2007. Distribution of precursors in human corneal stromal cells and endothelial cells. *Ophthalmology*. 114:433–439. doi:10.1016/j.optha.2006.07.042.
- Yamazaki, D., T. Oikawa, and T. Takenawa. 2007. Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J. Cell. Sci*. 120:86–100. doi:10.1242/jcs.03311.
- Yang, R., X. Sha, M. Zeng, Y. Tan, Y. Zheng, and F. Fan. 2011. The influence of phacoemulsification on corneal endothelial cells at varying blood glucose levels. *Eye Sci*. 26:91–95. doi:10.3969/j.issn.1000-4432.2011.02.018.
- Yao, Y.-F., Y.-M. Zhang, P. Zhou, B. Zhang, W.-Y. Qiu, and S.C.G. Tseng. 2003. Therapeutic penetrating keratoplasty in severe fungal keratitis using cryopreserved donor corneas. *British Journal of Ophthalmology*. 87:543–547.
- Yap, A.S., and E.M. Kovacs. 2003. Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J. Cell Biol*. 160:11–16. doi:10.1083/jcb.200208156.
- Yin, F. 2005. LPA and S1P Increase Corneal Epithelial and Endothelial Cell Transcellular Resistance. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 46:1927–1933. doi:10.1167/iovs.04-1256.
- Yonemura, S., M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1998. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol*. 140:885–895.
- Yunliang, S., H. Yuqiang, L. Ying-Peng, Z. Ming-Zhi, D.S.C. Lam, and S.K. Rao. 2007. Corneal endothelial cell density and morphology in healthy Chinese eyes. *Cornea*. 26:130–132. doi:10.1097/ICO.0b013e31802be63e.
- Zavala, J., G.R.L.O.P. Jaime, C.A.R.I.G. Barrientos, and J. Valdez-Garcia. 2013. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye*. 27:579–588. doi:10.1038/eye.2013.15.

- Zhang, J., and D.V. Patel. 2015. The pathophysiology of Fuchs' endothelial dystrophy--a review of molecular and cellular insights. *Experimental Eye Research*. 130:97–105. doi:10.1016/j.exer.2014.10.023.
- Zhou, K., A. Muroyama, J. Underwood, R. Leylek, S. Ray, S.H. Soderling, and T. Lechler. 2013. Actin-related protein2/3 complex regulates tight junctions and terminal differentiation to promote epidermal barrier formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110:E3820–9. doi:10.1073/pnas.1308419110.
- Zhu, Y.-T., Y. Hayashida, A. Kheirkhah, H. He, S.-Y. Chen, and S.C.G. Tseng. 2008. Characterization and comparison of intercellular adherent junctions expressed by human corneal endothelial cells in vivo and in vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 49:3879–3886. doi:10.1167/iovs.08-1693.



ANEXO



VIII. ANEXO

Cornea

Activation of Rac1 and RhoA Preserve Corneal Endothelial Barrier Function

María C. Ortega,¹ Diana Santander-García,¹⁻⁴ Beatriz Marcos-Ramiro,¹ Susana Barroso,¹ Susan Cox,⁵ Ignacio Jiménez-Alfaro,^{2,3} and Jaime Millán¹

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid, Spain

²Department of Ophthalmology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

³Instituto de Investigación Sanitaria, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

⁴Department of Ophthalmology, Hospital Universitario Rey Juan Carlos, Móstoles, Madrid, Spain

⁵King's College London, Randall Division of Cell and Molecular Biophysics, New Hunt's House, Guy's Campus, London, United Kingdom

Correspondence: Jaime Millán, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM-CSIC, Cantoblanco, Madrid 28770, Spain; jmillan@cbm.csic.es.

MCO and DS-G contributed equally to the work presented here and should therefore be regarded as equivalent authors.

Submitted: May 30, 2016

Accepted: October 4, 2016

Citation: Ortega MC, Santander-García D, Marcos-Ramiro B, et al. Activation of Rac1 and RhoA preserve corneal endothelial barrier function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:XXX-XXX. DOI:10.1167/iov.16-20031

PURPOSE. The corneal endothelium is responsible for the correct hydration of the corneal stroma. Corneal endothelial cells have a low proliferative capacity, so preserving their barrier function under suboptimal conditions that cause osmotic imbalance, such as those arising from corneal pathologies, age, cryopreservation, and transplantation, is essential for maintaining corneal transparency. We have investigated the signaling induced by hyperosmotic shock that reversibly disrupts corneal endothelial barriers in human endothelial cells and in murine corneas.

METHODS. Endothelial barrier properties were analyzed in vitro by electric cell substrate impedance sensing (ECIS) and confocal microscopy of the human endothelial cell line B4G12-HCEC, and, ex vivo, by confocal microscopy and stimulated emission-depletion (STED) super-resolution microscopy of murine corneas. Cell signaling in response to hyperosmotic stress induced with an excess of sodium chloride was investigated in B4G12-HCECs. Rho GTPase activity was detected by pulldown assays with recombinant GST proteins fused to the Rho binding domains of Rho effectors.

RESULTS. Hyperosmotic stress increased actin polymerization and activated the Rho GTPases Rac1 and RhoA, but not Cdc42. Rac1- and RhoA-mediated pathway inhibition had a minor effect on barrier disruption but partially delayed barrier reformation after stress withdrawal. In contrast, Rac1 and RhoA activation enhanced constitutive endothelial barrier function and accelerated barrier repair.

CONCLUSIONS. Our results indicate that Rac1 and RhoA activation do not mediate stress-induced cell contraction but are endothelial responses that act to restore and maintain barrier homeostasis. Therefore, pharmacological activation of these two GTPases could be a therapeutic strategy for preserving corneal endothelial barrier function.

Keywords: barrier function, Rac1, osmotic stress, RhoA, ROCK

The corneal endothelium is a monolayer of hexagonal cells located between the anterior chamber and the corneal stroma. The barrier integrity of the endothelium and its active fluid pump mechanism are involved in maintaining the stromal deturgescence required for corneal transparency.¹⁻³ Abnormalities in the integrity of the barrier of the corneal endothelium are observed under pathological conditions such as Fuchs' dystrophy and uveitis, wherein they are associated with irreversible corneal swelling, loss of vision, and the need for transplantation.^{3,4} Preserving the integrity of the endothelium is also a major concern in ophthalmic procedures such as intraocular surgery and corneal transplantation, because mechanical, inflammatory, and osmotic stress can cause loss of endothelial cells.^{5,6} Its role in maintaining corneal deturgescence renders the corneal endothelial monolayer particularly sensitive to osmotic changes, in which the balance between the transcellular transport of water and ions and the paracellular pathway mediated by intercellular junctions seems to be critical

for ensuring correct hydration.⁷ Indeed, corneal endothelial cells selectively express protein machinery to prevent osmotic imbalance.⁸

Although the presence of corneal endothelial progenitor cells has recently been described in adults,^{9,10} mature corneas have a low proliferative capacity.¹⁰ In this respect, improving endothelial barrier function under homeostatic conditions and in response to stress is crucial for maintaining corneal functionality, even at reduced endothelial cell density. Endothelial barrier function depends on cell-cell junctions, of which tight junctions (TJs) are essential in the corneal endothelium.⁷ In addition, tight junctional complexes associate with the perijunctional actin cytoskeleton through linker proteins, such as zonula occludens-1 (ZO-1). Perijunctional actin stabilizes cell-cell junctions, but also mediates cell contraction and junctional disruption.¹¹

The Rho family of GTPases comprises more than 20 members, of which RhoA, Rac1, and Cdc42 are the main



regulators of the cell-cell junctions and the underlying actomyosin network. The RhoA-mediated pathway can play opposing functions by increasing the assembly of actomyosin filaments during cell contraction, disrupting cellular barriers, and stabilizing cell-cell junctions in various cell types.^{12,13} This pathway is mainly controlled by protein phosphorylation mediated by its effectors, the Rho kinases (ROCKs). ROCKI and ROCKII enhance actomyosin contractility by inactivating myosin phosphatase and promoting myosin light chain (MLC) phosphorylation.^{14,15} In addition, Rac and Cdc42 activities are required to maintain barrier integrity^{16–19} by mediating the formation of actin filaments that associate with proteins from junctional complexes, such as ZO-1 and α -catenin at the cell periphery.²⁰ Tight and adherens junctions form complexes with GTPase exchange factors that locally activate RhoA, Rac, and Cdc42. These interactions not only induce a local increase in F-actin, but also regulate the endocytosis, recycling, and degradation of junctional protein complexes.^{21,22} The function of each of these Rho GTPases in regulating integrity of corneal endothelial barriers has not yet been addressed in detail, but the analysis of downstream signaling proteins, such as ROCK and nonmuscle myosin II, suggests that at least RhoA is involved in corneal endothelial barrier function.^{23–25}

With the ultimate aim of preserving corneal endothelial barrier function, we have investigated signals underlying the endothelial response to stress, and then targeted them with pharmacological inhibitors and activators to investigate their role. We have found that hyperosmotic stress activates RhoA and Rac1 but not Cdc42. The inhibition of pathways controlled by RhoA and Rac1 had a moderate effect on barrier contraction and delayed barrier recovery after the withdrawal of stress. In contrast, pharmacological RhoA and Rac1 activation greatly improved endothelial barrier recovery, which suggests that RhoA and Rac1 activation are major homeostatic responses of these cells by which they try to recover their barrier properties. Thus, in corneal endothelium, RhoA and Rac1 activation increase barrier function and could be therapeutic targets for preserving corneal functionality.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Three-month-old female CD1 mice were used as a source of corneal tissue. All animal manipulations were carried out in accordance with Spanish (RD53/2013) and European (86/609/ECC) regulations, and were approved by the institutional Animal Care and Use Committee of Centro de Biología Molecular Severo Ochoa and Consejo Superior de Investigaciones Científicas. All efforts were made to minimize suffering of the mice. The authors adhered to the ARVO animal statement.

Chemicals and Antibodies

RhoA inhibitor (C3-transferase), RhoA/Rac1/Cdc42 activator (Rho activator I), RhoA activator (Rho activator II) were purchased from Cytoskeleton (City, State, Country). ROCK inhibitor (Y27632) and Rac1 inhibitor (Ehop) were obtained from Sigma-Aldrich (City, State, Country). Anti-ZO-1 antibody was from Zymed Laboratories (City, State, Country), anti-RhoA and anti-Erk1/2 antibodies were from Santa Cruz (City, State, Country), and anti-Rac1 and anti Cdc42 antibodies were from BD Transduction Laboratories (City, State, Country). TRITC-conjugated phalloidin was obtained from Sigma-Aldrich. Peroxidase conjugated affinipure donkey anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG were purchased from Jackson Immunoresearch

(City, State, Country). Alexa 488 donkey anti-rabbit IgG was obtained from ThermoFisher (City, State, Country).

??

Human Corneal Specimens

Human corneal tissue was obtained from remnants of donor grafts after central donor trephination prior to keratoplasty. Donors had no history of eye disease, ocular surgery, or any other systemic disease that might have affected the corneas. Corneal rims were maintained in culture with Tissue C medium at 31°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Endothelial Cell Culture

The human corneal endothelial cell line B4G12 (HCEC) was cultured as described elsewhere.²⁶ Briefly, cells were grown in human endothelial serum-free medium from Gibco-Thermo Fisher Scientific (City, State, Country), supplemented with 20 ng/mL of FGF-2. Cells were cultured on plastic dishes precoated with 150 μ g/mL rat collagen-I, at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained and cultured as described.²⁷ Briefly, HUVECs were obtained by digesting the vein of umbilical cords with 0.1% collagenase at 37°C for 20 minutes (after approval by the donor and the ethics committee). Endothelial cells were collected and grown on fibronectin-coated flasks (10 μ g/mL; Nunclon, City, State, Country) with EBM-2 medium supplemented with 2% FBS and endothelial cell growth factor (EGM-2) following the manufacturer's instructions (Lonza, City, State, Country). For barrier function assays, HCECs were cultured at confluence for a minimum of 48 hours prior to carrying out the experiments. To attain confluence, 2×10^5 cells per well were seeded in the ECIS 8WE10 arrays and in the μ -Slide eight-well dishes containing plastic polymer coverslips from Ibidi (City, State, Country), and 3×10^6 cells were seeded on 60-mm diameter plastic dishes to perform pulldown assays.

??

Osmotic Stress in HCECs and Thrombin Stimulation in HUVECs

Hyperosmotic shock in HCECs was induced as follows. Cells were starved for 1 hour with Hank's balanced salt solution (HBSS) to reduce cell signaling from nutrients and growth factors and to control the pH when cells were manipulated outside of the incubator. Human corneal epithelial cells were either not treated or exposed for 1 to 60 minutes to HBSS supplemented with NaCl at concentrations from 50 to 600 mM, depending on the assay, or to HBSS supplemented with 10% to 20% of mannitol for 1 to 10 minutes. Hypo-osmotic stress was induced by exposing cells to HBSS diluted with 25% or 50% H₂O for 1 to 10 minutes. To promote the reassembly of TJs after osmotic stress, supplemented or diluted HBSS was replaced with fresh HBSS and incubated for a maximum of 180 minutes. As control experiments to address the efficacy of Y27632 and C3-transferase, HUVECs were seeded at confluence on the μ -Slide dishes precoated with fibronectin (10 μ g/mL) and pretreated, when indicated, with 5 μ M Y27632 (for 30 minutes) or 0.5 μ g/mL C3-transferase (for at least 2 hours) before stimulation with 1 vU/mL thrombin for 30 minutes.

Osmotic Stress in Murine Corneas

Dissection and whole-mount staining of mature corneas were performed as follows. Eyes were dissected out and placed into Tissue C medium (TC). After iris and lens removal, corneas were exposed to TC alone or TC supplemented with 225 mM

NaCl, inducing osmotic stress for 2 hours. This excess of NaCl induced reversible barrier disruption without significant cellular damage. Endothelial barrier recovery was measured after replacing hyperosmotic TC solution with fresh TC. Corneas were pretreated with Y-27632 (5 μ M) in TC for 30 minutes before the hyperosmotic shock in order to analyze the effect of ROCK inhibition on TJ disassembly. Y-27632 was maintained throughout the experiment to examine its effect during the recovery of endothelial barrier. For RhoA inhibition, corneas were treated with C3-transferase (1 μ g/mL) for 4 hours before exposure to osmotic stress. To analyze the effect of RhoA signaling inhibition during the recovery of barrier integrity, inhibitors were added in TC after osmotic stress withdrawal and maintained for 8 hours in TC. Experiments with Rho activator I (1 μ g/mL) and RhoA activator II (5 μ g/mL) were performed in a similar manner to those described for the inhibitors. Corneas were pretreated with these activators for 2 hours before osmotic stress to analyze their effect on TJ disruption. To analyze their involvement in the endothelial barrier recovery, hyperosmotic TC was replaced with TC containing the activators at the indicated concentrations.

Measurement of TEER (ECIS Assay)

Human corneal epithelial cells (2×10^5 cells per well) were seeded on eight-well arrays (8WE10) from Ibidi, containing 10 gold electrodes per well. Wells were precoated with rat-collagen-I. Forty-eight to 72 hours later, transendothelial electric resistance (TEER) was measured in the arrays with the 1600R electric cell substrate impedance sensing (ECIS) system from Applied Biophysics (City, State, Country). Each experimental condition was measured in duplicate in each experiment. Before applying the osmotic stress, TEER was measured to verify that the cell monolayer had reached a steady state. Cells were starved with HBSS for 1 hour, which had no significant effect on TEER, and then subjected to stress as described. TEER values were normalized with respect to those obtained before the osmotic shock. During NaCl treatment, TEER was monitored for a maximum of 1 hour and, after stress withdrawal, TEER changes were recorded for 2 hours to analyze junction reformation. The percentage of TEER reduction induced by the different experimental conditions was calculated taking into account the average normalized resistance (NR) for ECIS electrodes containing fully contracted cells (observed in NaCl-treated cells) and the average NR of untreated cells (control confluent monolayers produced an average NR value of approximately 1 at the beginning of the experiment). The percentage of reduction in TEER was calculated as $[(1 - \text{NR experimental condition}) / (1 - \text{NR NaCl}) \times 100]$.^{27,28}

Pulldown Assays for Measuring Rho GTPase Activity

The levels of activated GTP-bound Rho, Rac, and Cdc42 were measured by pulldown assays.²⁹ Briefly, confluent HBSS-starved HCECs were exposed to the indicated osmotic stress for 0, 2, and 10 minutes. Cells were lysed on ice with 0.5 mL of lysis buffer containing 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5 M NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM EDTA pH 8, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, and 10 μ g/mL leupeptin, aprotinin, and pepstatin. Two lysates from two culture dishes of 10-cm diameter were pooled per condition. Cell lysates were centrifuged for 5 minutes at 12,000 rpm at 4°C. An aliquot of each postnuclear supernatant was kept to measure total Rho protein levels. The supernatants were then incubated with the 10- μ g recombinant GST proteins previously bound to glutathi-

one-Sepharose beads for 40 minutes at 4°C. Rho proteins bound to recombinant GST proteins were pulled down by centrifugation for 60 s at 3000 rpm at 4°C. Pulldowns were thoroughly washed with lysis buffer by three additional low-speed centrifugations. Active RhoA was precipitated by pulldown with GST-rhotekin-RBD, a chimeric GST protein containing the Rho binding domain (RBD) of a Rho effector called rhotekin. Active Rac1 and Cdc42 were isolated by pulldown with GST-PAK-PBD, which contains the Rac1 and Cdc42 (p21) binding domain (PBD) of the common effector p21 activated kinase (PAK)-1. After the pulldown was completed, 10 μ L of the initial postnuclear supernatants (total Rho proteins) and 10 μ L of the 30 μ L of the final pulldown fraction (active Rho proteins) were subjected to SDS-PAGE in 12% acrylamide gels under reducing conditions and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, City, State, Country). After blocking with 5% nonfat dry milk, 0.05% (vol/vol) Tween20 in PBS, the membranes were incubated with antibodies against RhoA, Rac1, and Cdc42. ERK1/2 was blotted as a loading control. After extensive washes, the membranes were developed using an enhanced chemiluminescence Western blotting kit (ECL; GE Healthcare Life Sciences, City, State, Country). The increase in GTP-loading of Rho proteins with respect to unstimulated cells was determined in the Western blots by calculating the ratio between band intensity in the pulldown lanes (active) and the corresponding band intensity in the lanes containing postnuclear supernatants (total), normalized by the loading controls. Statistical analysis was calculated from a minimum of three independent experiments.

Immunofluorescence, Confocal Microscopy, and Stimulated Emission Depletion Super-Resolution Microscopy. Corneas, HCECs, and HUVECs were fixed for 1 hour in 4% paraformaldehyde (PFA) and then stored in PBS at 4°C. Cells were permeabilized using 0.2% Triton X-100 for 5 minutes on ice. After blocking with 3% BSA in PBS for 1 hour at room temperature, corneas were incubated overnight at 4°C in blocking solution containing rabbit anti-ZO-1 primary antibody (1:400). For detection, Alexa Fluor-coupled secondary rabbit antibody (1:1000) was used. This was followed by staining for F-actin with TRITC-conjugated phalloidin (1:4000). Tight junctions distribution was measured as the percentage of cell junction area containing ZO-1, using the F-actin staining with phalloidin to detect cellular morphology and total cell-cell junction area. The changes in total F-actin fluorescence intensity during the osmotic stress assays were quantified with the ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>; provided in the public domain by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) by measuring the raw integrated intensity from confocal images of HCECs stained with TRITC-conjugated phalloidin, taken under the same laser power and gain conditions. An average of 17 cells per image, from eight images taken per experimental condition, performed as technical duplicates (4 images per coverslip) in each experiment, from at least three independent experiments, were analyzed. Perijunctional ZO-1 in murine corneas was quantified from three different images per experiment, each containing an average of 20 cells. Perijunctional ZO-1 was quantified in 10 representative cells per image from a minimum of three independent experiments. Stimulated emission depletion (STED) super-resolution microscopy, was carried out on a Leica TCS SP5 II STED microscope (Leica, City, Germany), with STED being used to detect fluorescence from the ATTO-647N fluorophore. Excitation was carried out by a 635-nm pulsed diode laser; de-excitation was done by a MaiTai tunable fs laser (City, State, Country at 750 nm. Super-resolution images are presented in inverted gray scale format to ensure the features are displayed clearly.

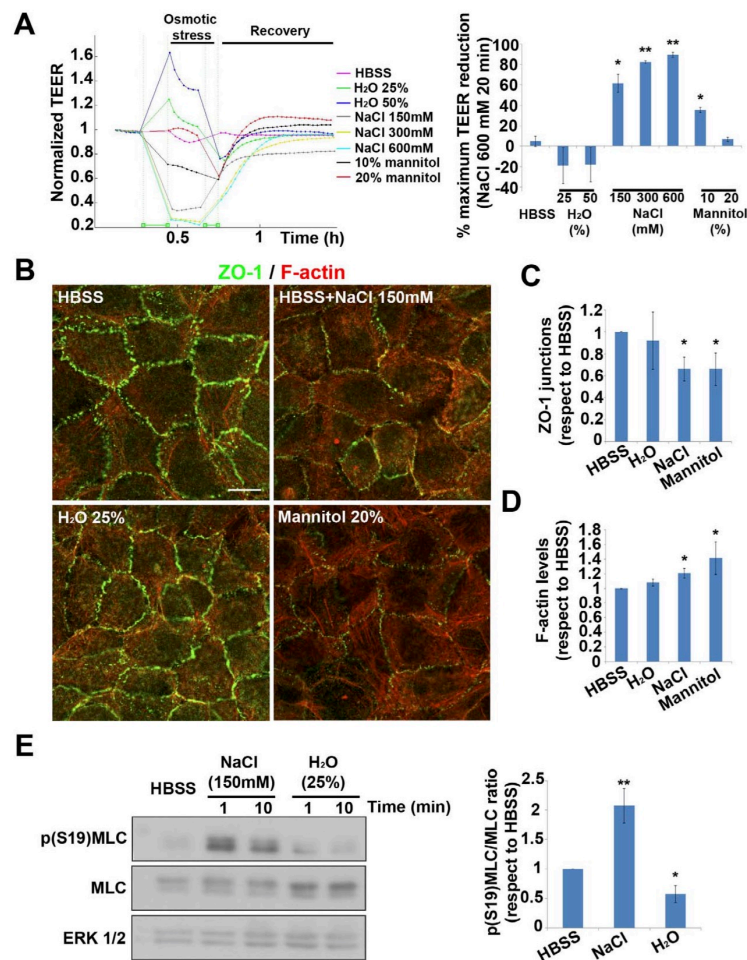


FIGURE 1. Effect of osmotic stress on corneal endothelial barrier function. (A) *Left*: measurements of changes in TEER in confluent HCECs exposed to the indicated HBSS solutions containing the indicated excess of H₂O, mannitol, and NaCl. These treatments induce reversible changes in barrier function upon 10-minute exposure to osmotic stress. *Right*: quantification of TEER reduction after 10-minute exposure to the indicated osmotic stresses. Maximum TEER reduction (100%) in HCECs was obtained by incubation with 600-mM excess NaCl for 20 minutes. (B) Effect of osmotic stress on the TJ marker ZO-1. (C) Quantification of the junctional area positive for ZO-1 in cells exposed to 25% excess of H₂O (hypo-osmotic), 300-mM excess NaCl (hyperosmotic), and 20% mannitol (hyperosmotic), normalized with respect to HCECs in iso-osmotic conditions (HBSS). (D) Quantification of F-actin levels in cells exposed to 25% excess of H₂O, 300-mM excess of NaCl, and 20% mannitol, normalized with respect to HCECs in HBSS. (E) Effect of the indicated osmotic stress on the phosphorylation in Ser19 of myosin light chain (p(Ser19)MLC). *Right graph*, quantification of the ratio between p(Ser19)MLC and total MLC levels detected by Western blot in cells exposed to 10 minutes of the indicated stress in three different experiments. *Graphs* represent the mean \pm SEM * P < 0.05; ** P < 0.005. Scale bar represents 10 μ m.

Statistical Analysis

The data were summarized as the mean \pm SEM. Pairs of groups were compared using Student's *t*-test (parametric data). Values of *P* less than or equal to 0.05 were considered to be statistically significant, with critical values indicated as: * P < 0.05; ** P < 0.01; and *** P < 0.001. All statistical analyses were performed using SPSS 15.0 for Windows (City, State, Country).

RESULTS

Osmotic Stress Alters the Barrier Properties of Human Endothelial Cells

In order to investigate the signals activated in response to hyperosmotic stress, we exposed confluent monolayers of the HCEC line B4G12²⁶ to increasing concentrations of mannitol

and sodium chloride (NaCl). These treatments provoked a reduction in TEER, measured with an ECIS system, which is indicative of a decrease in endothelial barrier function (Fig. 1A). Conversely, hypo-osmotic stress had an opposite effect and increased TEER. These effects were transient and did not induce significant cellular loss, because TEER values recovered after withdrawal of the osmotic challenge. Parallel confocal analysis of these cells revealed that hypertonicity dispersed the TJ component ZO-1 from cell-cell junctions, whereas hypotonicity did not significantly alter the distribution of this protein (Figs. 1B, 1C). Hyperosmotic stress also increased F-actin levels, suggesting that it affected actomyosin-mediated contraction (Fig. 1D). Nonmuscle myosin II isoforms are protein motors that interact with F-actin and increase actomyosin contractility. Myosin activity is controlled by the MLC, which becomes active upon phosphorylation in a serine residue at position 19. In accordance with the increase in F-actin levels,

MLC phosphorylation, detected by Western blot with an antibody against the phosphorylated (p) S19 of MLC, increased in cells exposed to hyperosmotic stress, but not to hypo-osmotic stress (Fig. 1E).

We performed similar experiments with corneas *ex vivo* to address the effect of hyperosmotic stress in response to salt excess, which occurs *in vivo*, for instance, in the stroma of corneas lacking ion transporters.⁸ First, murine corneas were dissected out and exposed to a range of hyperosmotic stress conditions (not shown). Consistent with the reduction in TEER observed in the corneal cell line, the formation of intercellular gaps became evident in murine endothelium exposed to an excess of 225-mM NaCl between 1 and 2 hours, as shown by the ZO-1 distribution (Fig. 2A). ZO-1 was linearly distributed between the two perijunctional actomyosin rings (PAMRs), characteristic of these hexagonal cells, under iso-osmotic conditions (Fig. 2A, enlarged areas). In response to the osmotic shock, the PAMR increased, whereas ZO-1 disappeared in some junctional domains and acquired a more punctate and intense distribution in some others, which overlapped with the F-actin staining (Fig. 2A, bottom images). This overlapping increase in the distribution of the remaining junctional ZO-1 and F-actin was also observed in human endothelium from corneoscleral rims subjected to increasing concentrations of NaCl (Fig. 2B). We then investigated in more detail the changes in F-actin and ZO-1 distribution upon hyperosmotic stress by analyzing the murine corneas by super-resolution confocal microscopy. STED microscopy of the PAMR revealed a perijunctional actin ring formed by bundles of actin filaments (Fig. 2C, arrowheads). Adjacent PAMR appeared connected by F-actin filaments emerging perpendicular to the main actin ring (Fig. 2C, enlarged areas). However, ZO-1 did not colocalize with these F-actin structures. Upon hyperosmotic stress, ZO-1 was dispersed and the PAMR and the perpendicular F-actin connections increased in size and intensity. Interestingly, the ZO-1 clusters that remained at cell borders aligned with these F-actin bundles, suggesting that they mediate the disruption of TJs in response to stress (Fig. 2C, enlarged areas).

RhoA and Rac1, but Not Cdc42, Are Activated in Response to Hyperosmotic Stress. To further address the cell responses induced by hyperosmotic stress, we analyzed the activity of the Rho GTPases RhoA, Rac1, and Cdc42, which are the master regulators of the actin cytoskeleton and cell barrier function, and are expressed in the mature corneal endothelium.³⁰ In their active state, most GTPases are loaded with GTP. We examined the GTP-bound state of RhoA, Rac1, and Cdc42, by pull-down assay with recombinant proteins containing Rho-binding domains from Rho effectors that specifically bind these GTP-loaded (active) Rho proteins (Figs. 3A, 3B). We compared the levels of RhoA and Rac1 expression in the cell lysates (Total) with those in the pull-down fractions, which correspond to the GTP-loaded forms of RhoA and Rac1 bound to the recombinant proteins (Active), by Western blot with anti-RhoA and Rac1-specific antibodies. RhoA- and Rac1-GTP levels increased significantly in response to hyperosmotic shock (Fig. 3). In contrast, Cdc42 activation was minor and not statistically significant. We detected an increase in RhoA and Rac1 activity with an excess of NaCl as low as 50 mM (Fig. 3A), although this was more moderate than with an excess of 150-mM NaCl (Fig. 3B). These results demonstrate that hyperosmotic stress activates the signaling pathways controlled by RhoA and Rac1, but not Cdc42, in HCECs.

RhoA and Rac1 Inhibition Do Not Prevent Endothelial Barrier Disruption and Delays Barrier Recovery After Stress Withdrawal. To gain insights into the role of RhoA in disrupting the corneal endothelial barrier after osmotic stress, we pretreated cells with C3 transferase, a specific inhibitor of

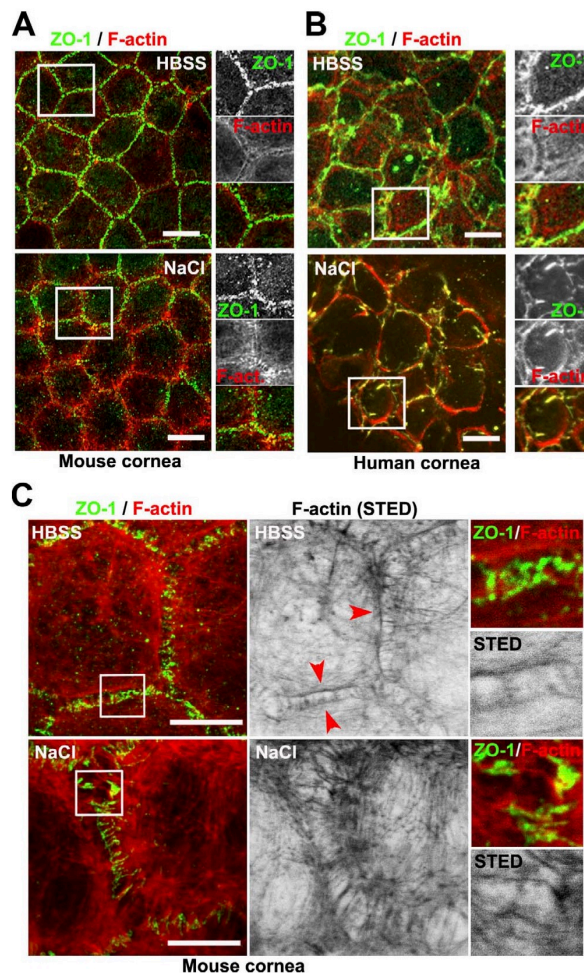


FIGURE 2. Effect of hyperosmotic stress in the endothelium of murine and human corneas. (A) Murine adult corneas were dissected out and incubated in HBSS or in HBSS containing an excess of 225 mM NaCl for 1 hour, fixed, and stained for ZO-1 and for F-actin. (B) Human corneoscleral rims were donated after transplantation and incubated in HBSS or in HBSS containing 300 mM NaCl for 1 hour, fixed, and stained for ZO-1 and for F-actin. Scale bars, 20 μ m. (C) Imaging TJs and the PAMR by super-resolution confocal microscopy. Dissected murine corneas were incubated in HBSS or in HBSS containing 225 mM NaCl for 1 hour, fixed, and stained for ZO-1 and for F-actin. STED microscopy reveals bundles of actin filaments parallel to the cell border (arrows) and perpendicular actin connections between cells (see enlargements of the STED images). ZO-1 is localized in areas between cells with low F-actin staining (see enlargement of the *squared area* in the ZO-1/F-actin image). With an excess of NaCl, the PAMR and the perpendicular F-actin connections increase in size and intensity and ZO-1 clusters align with the F-actin connections between adjacent PAMRs. *Right images* in each *panel* correspond to enlargements of the corresponding *squared areas*. Scale bars, 5 μ m.

Rho, conjugated to a permeable peptide.^{31,32} C3 transferase selectively ribosylates RhoA in its effector binding domain, inducing a shift in its molecular weight and inactivating it, as shown by pull-down assay (Supplementary Fig. 1A).²⁹ C3 transferase did not attenuate TEER decrease during NaCl exposure (Fig. 4A, Supplementary Fig. 1B). However, after stress withdrawal, C3 transferase caused a moderate but statistically significant delay in endothelial barrier recovery (Fig. 4A, Supplementary Fig. 1B). Among the many RhoA

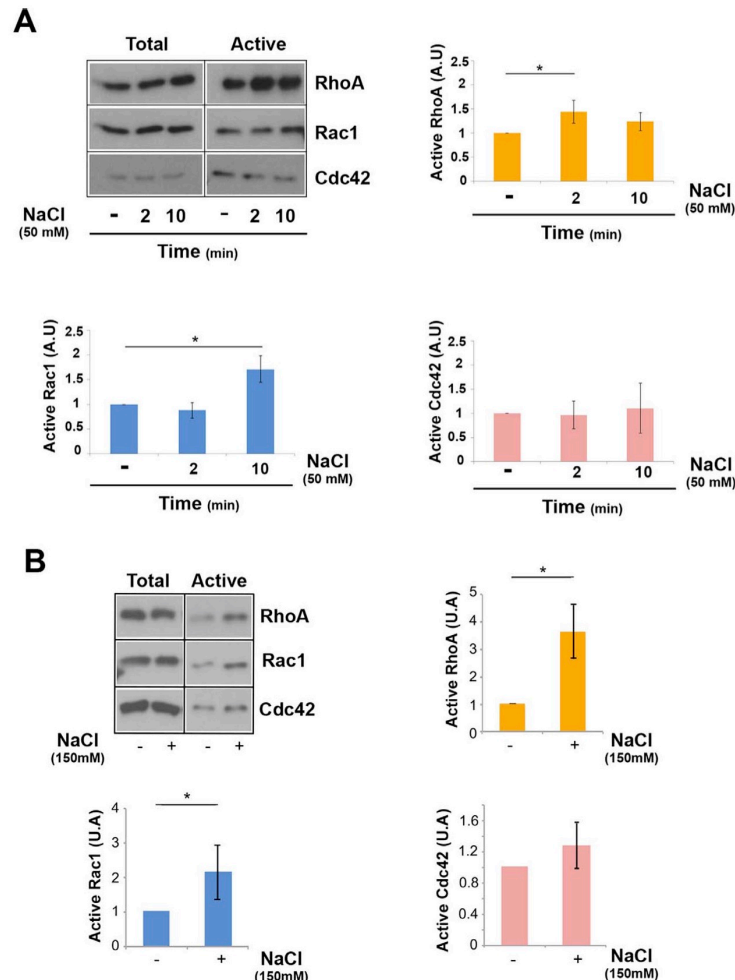


FIGURE 3. Hyperosmotic stress activates RhoA and Rac1 but not Cdc42. Pulldown assays of RhoA, Rac1, and Cdc42 in confluent HCEC subjected to hyperosmotic stress of (A) 50-mM excess NaCl for the indicated times, and of (B) 150-mM excess NaCl for 10 minutes. *Graphs* show the quantification of active Rho normalized to total Rho levels from at least three experiments and represent the mean + SEM. * $P < 0.05$.

effectors, the Rho kinase (ROCK) controls cellular barrier function and mediates actomyosin contractility in different cellular settings.¹⁵ The ROCK inhibitor Y27632, moderately attenuated TEER decrease during hyperosmotic shock and slightly delayed subsequent barrier recovery after the return to iso-osmolarity (Fig. 4B, Supplementary Fig. 1C). To address the role of Rac1, we pretreated cells with Ehop-016³³ and analyzed endothelial barrier function. Ehop-016 inhibited Rac1 activity in HCEC exposed to hyperosmotic shock (Supplementary Fig. 1A). However, EHop-016 modified neither TEER decrease during hyperosmotic treatment, nor barrier function recovery (Fig. 4C, Supplementary Fig. 1D). Pretreatment of HCEC with C3 and Y27632 reduced thrombin-mediated contraction to a lesser extent than what was previously found in other cell monolayers^{27,34} (Fig. 4D). Therefore, although we observed a clear activation of RhoA and Rac1 in response to a hypertonic shock, their inhibition had a minor effect on HCEC barrier disruption. Moreover, inhibiting RhoA-mediated signaling slightly delayed barrier recovery upon stress withdrawal.

To confirm the moderate effect of Rho and ROCK inhibition on barrier reformation, we performed similar experiments with ex vivo murine corneas. These were dissected out and exposed

to hyperosmotic stress induced with an excess of NaCl (Supplementary Fig. 2). Although murine endothelium pretreated with RhoA signaling inhibitor (C3 transferase) had lower endothelial F-actin levels than the untreated endothelium before the stress, C3-transferase did not inhibit the increase in the perijunctional F-actin staining occurring in response to the stress (Fig. 5A). Ex vivo barrier reformation assays were performed by exposing the corneas to hypertonic stress and then, when indicated, incubating them with the inhibitors after stress withdrawal (Fig. 5B). This confirmed that osmotic stress did not affect cell viability, because ZO-1 perijunctional staining was fully recovered 8 hours after its removal. We quantified the percentage of ZO-1 at cell borders in cells exposed or not exposed to stress, as well as in the barrier reformation assays, in the presence or absence of C3-transferase (Figs. 5C, 5D). Quantification revealed that the loss of TJs was not prevented by C3-transferase (Figs. 5A, 5D), suggesting that RhoA is not determinant for barrier disruption. In addition, C3-transferase clearly prevented cell-cell junction recovery (Figs. 5B–D). To determine the role of the RhoA effector ROCK in regulating the endothelial barrier function in murine corneas, we next analyzed the effect of Y27632 on

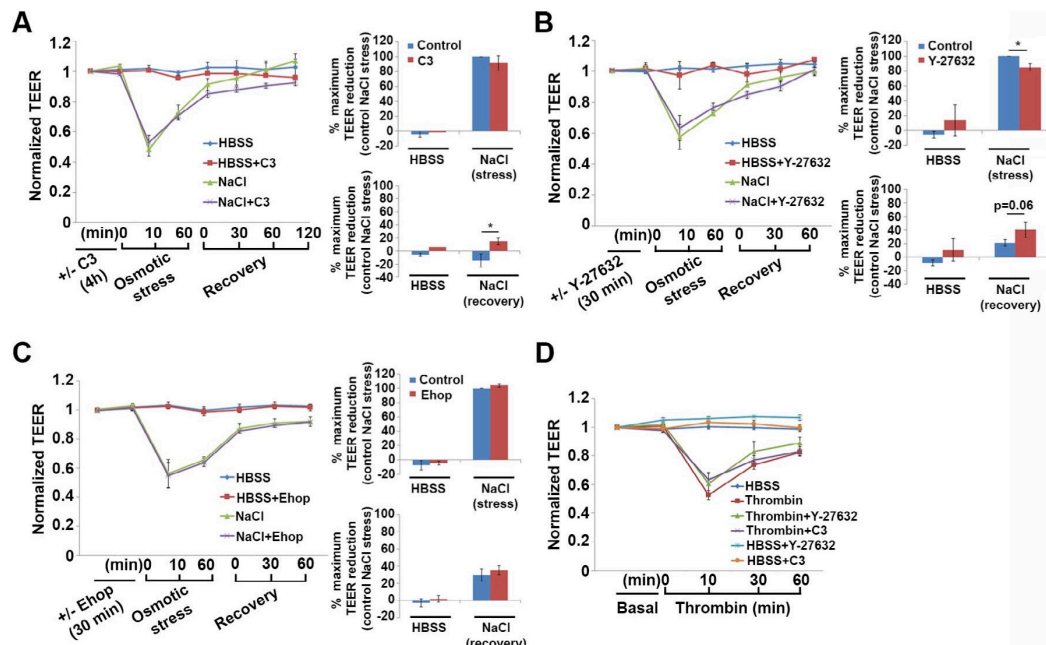


FIGURE 4. RhoA-ROCK and Rac1 inhibition do not prevent endothelial barrier dysfunction in response to hyperosmotic stress. Human corneal endothelial cells were grown to confluency in ECIS arrays containing gold electrodes and TEER was analyzed by ECIS. TEER was normalized relative to resistance values at the beginning of the assay. Absolute resistance values are shown in Supplementary Figure 1. (A) Effect of C3-transferase (0.5 μg/ml) on barrier contraction induced with 50-mM excess NaCl and the subsequent recovery upon return to iso-osmolality. (B) Effect of Y-27632 (5 μM) on barrier contraction and the subsequent recovery upon return to iso-osmolality. (C) Effect of Ehop-016 (5 μM) on barrier contraction and the subsequent recovery upon return to iso-osmolality. (D) Effect of C3-transferase and Y-27632 on thrombin-mediated barrier disruption. *Graphs represent the mean ± SEM of at least three different experiments* **P* < 0.05.

barrier disruption and recovery following the same quantification procedure (Fig. 5C). Similar to C3-transferase, Y-27632 had no effect on ZO-1 dispersion (Figs. 6A, 6C) but clearly prevented TJ reformation after stress withdrawal (Figs. 6B, 6C). Again, a reduction of F-actin levels in the presence of Y-27632 was observed before but not after, osmotic stress.

Finally, as a positive control of the effect of C3-transferase and Y-27632, HUVECs were stimulated with thrombin in the presence or absence of these inhibitors. Thrombin is a paradigmatic inflammatory mediator that induces F-actin in HUVECs by activating the RhoA-ROCK pathway.^{35,36} C3-transferase and Y-27632 clearly reduced the F-actin staining in unstimulated and thrombin-stimulated HUVECs (Supplementary Fig. 3) as previously described.^{34,35} Thus, similar to our in vitro results, our findings indicate that RhoA signaling is not required for acute contraction but for the restoration of endothelial barrier properties in murine corneas. RhoA and ROCK inhibitors prevented tight junction reformation, but had no effect on F-actin level increase in response to the osmotic stress in the corneal endothelium.

Rho and Rac1 Activation Attenuate Endothelial Barrier Disruption and Accelerate Barrier Recovery After Stress

Inhibition of signaling pathways regulated by RhoA affected TJ reformation and increased the dysfunction. We then hypothesized that RhoA and Rac1 activation in response to stress (Fig. 3) are cellular responses that aim to recover the homeostatic state of the endothelial monolayer. Therefore, their activation may favor, rather than undermine, barrier integrity. To address this hypothesis, Rho and Rac1 were activated with two

chimeric proteins containing the catalytic domain of a cytotoxic necrotizing factor toxin, conjugated to a penetrating peptide. These catalytic domains block the GTPase activity of various Rho proteins, resulting in constitutively active Rho.³⁷ Rho activator-I (Act-I) activates RhoA, Rac1, and Cdc42, and Rho activator-II (Act-II) specifically activates RhoA subfamily proteins. Pulldown assays revealed that Act-I activated Rac1 but had little effect on Cdc42 in HCECs (Supplementary Fig. 4). Act-I slightly reduced RhoA activity, probably because this molecule preferentially activates Rac1, which often negatively regulates RhoA function. In contrast, Act-II specifically activated RhoA, but did not induce Rac1 and Cdc42 activity (Supplementary Fig. 4). Human corneal epithelial cells were treated with Act-I and Act-II before osmotic stress. Both activators increased HCEC TEER before the hyperosmotic stress (Fig. 7A, 7B; Supplementary Figs. 5A, 5B) and reduced stress-induced barrier disruption (Fig. 7A; Supplementary Fig. 5A) and recovery (Fig. 7B; Supplementary Fig. 5B). Although the pulldown assays indicated that RhoA was not significantly activated by Act-I, we also performed experiments with Act-I in the presence of the ROCK inhibitor Y-27632, which confirmed that the RhoA pathway does not play a major role in the increase of Act-I-induced barrier function. Importantly, Act-I and Act-II significantly increased TEER in the absence of any stress, indicating a general and positive effect of RhoA and Rac1 activation on endothelial barrier function. The protective effect on barrier function was also observed in murine corneas, in which Act-I and Act-II reduced ZO-1 dispersion in response to hyperosmotic stress (Fig. 8A) and accelerated ZO-1 relocalization at cell-cell junctions during barrier restoration (Fig. 8B), when quantified as in Figure 5C. Interestingly, the effect of Act-I on barrier restoration required the presence of

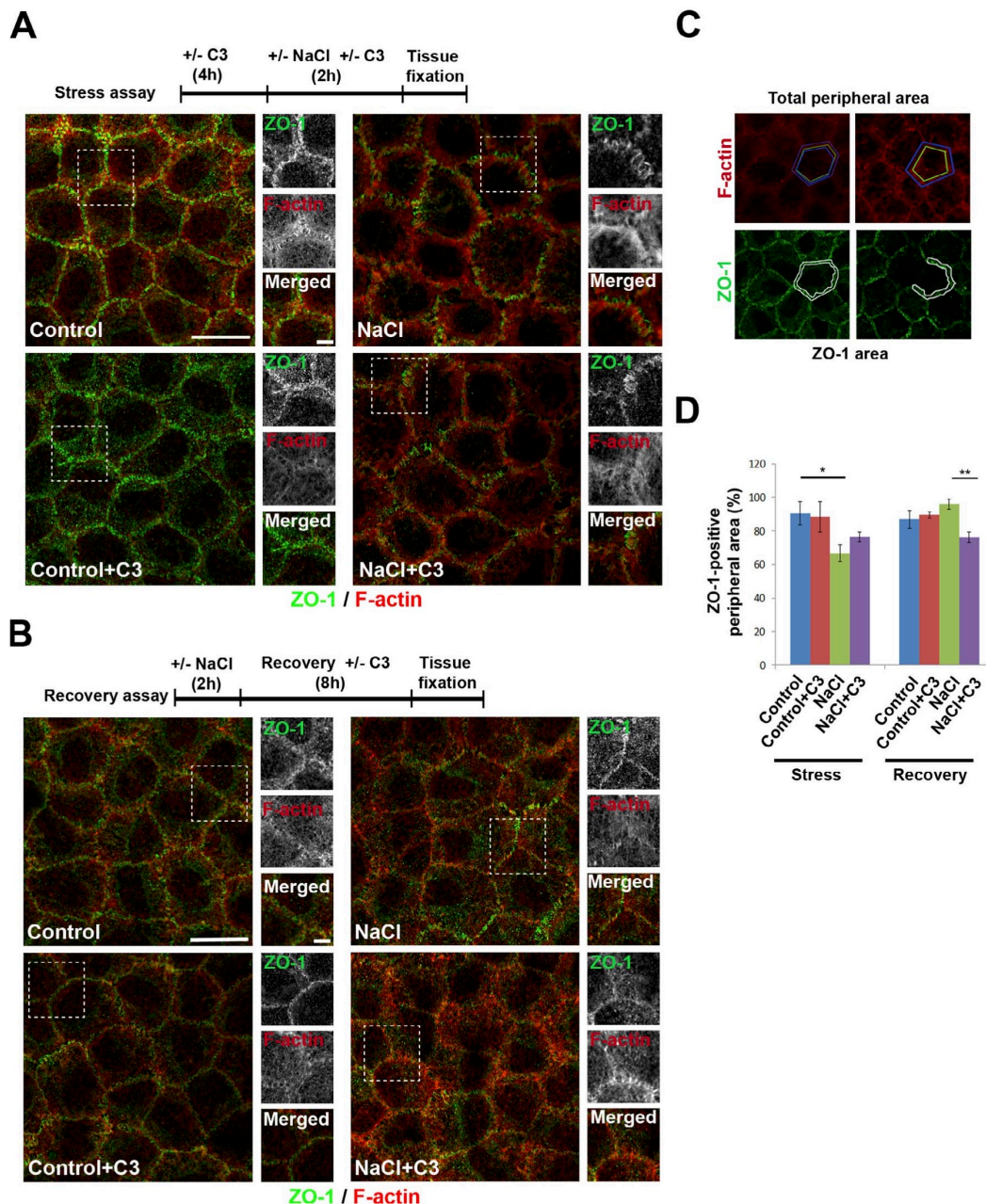


FIGURE 5. RhoA inhibition moderately reduces endothelial barrier recovery in murine corneas. Murine corneas were dissected out and subjected to the indicated treatments. (A) Effect of C3 transferase during hyperosmotic stress. Murine corneas were pretreated, when indicated, with C3-transferase (1 μ g/mL) and then subjected to hyperosmotic stress. Enlarged details of the *squared areas* are shown to the right of the images. (B) Effect of C3 transferase during endothelial barrier recovery. Murine corneas were exposed to hyperosmotic stress for 2 hour when indicated (NaCl). After stress withdrawal, corneas were incubated with C3-transferase when indicated. Enlarged details of the *squared areas* are shown to the right of the images. (C, D) Quantification of the junctional area occupied by ZO-1 from images like those in (A) and (B). (C) The PAMR was clearly identified with phalloidin-TRITC at cell-cell contacts under all experimental conditions, so the peripheral area of each cell could be determined by drawing a region of interest in ImageJ. The percentage of this area that is positive for ZO-1 staining was then calculated in each treatment. (D) Graph represents the mean \pm SEM of at least three different experiments like those shown in (A) and (B). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Scale bars, 20 μ m. Scale bars in enlarged areas, 4 μ m.

the ROCK inhibitor, suggesting that this activator acts differently on the murine ROCK pathway. Overall, our results indicate that RhoA and Rac1 are good targets for preserving and repairing corneal endothelial barriers under stress.

DISCUSSION

Rho GTPases play pleiotropic roles regulating the actin cytoskeleton and cell barrier function. In particular, RhoA-

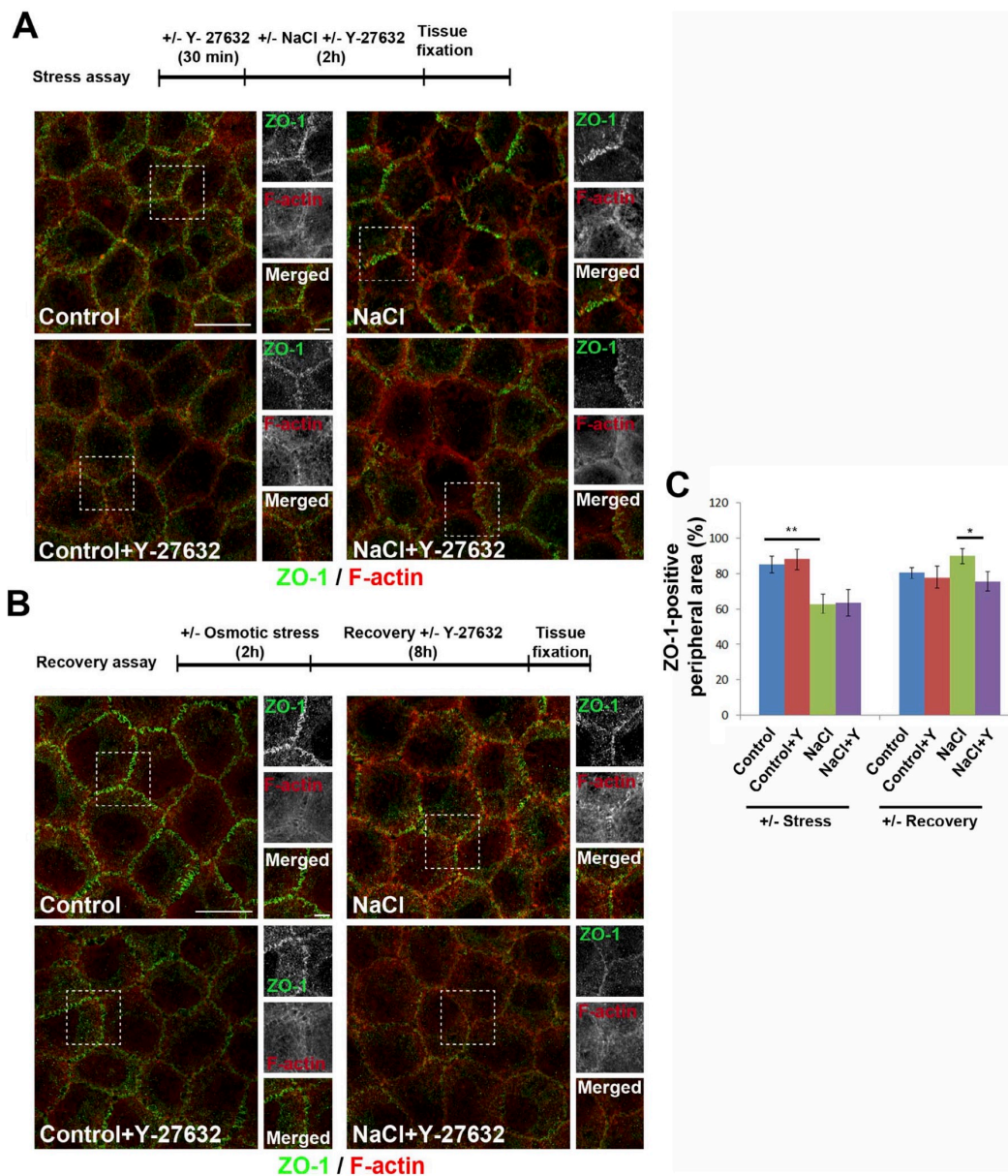


FIGURE 6. ROCK inhibition moderately reduces endothelial barrier recovery in murine corneas. Murine corneas were dissected out and subjected to the indicated treatments. **(A)** Effect of Y27632 during hyperosmotic stress. Murine corneas were pretreated, when indicated, with Y27632 (5 μ M) and then subjected to hyperosmotic stress. **(B)** Effect of Y27632 during endothelial barrier recovery. Murine corneas were exposed to hyperosmotic stress for 2 hours when indicated (NaCl). After stress withdrawal, the corneas were incubated with Y27632 when specified. **(A, B)** Enlarged details of the *squared areas* are shown on the *right* of the images. **(C)** Quantification of the junctional area occupied by ZO-1 in the stress and recovery assays was carried out as in Figures 5C and 5D. *Graph* represents the mean \pm SEM of at least three different experiments * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. *Scale bars*, 20 μ m. *Scale bars* in enlarged areas, 4 μ m.

and Rac1-mediated pathways can have opposing effects of disrupting and preserving cell barrier function, respectively, and by orchestrating the balance between actomyosin contraction and barrier reformation in various cell types.^{19,38–40} At the same time as being active in mediating actomyosin-mediated contraction, the Rho-ROCK pathway is also necessary for the homeostatic maintenance of cellular barriers.¹³ In vitro experiments in monolayers of bovine corneal endothelial cells, in which calcium is removed from the medium to disrupt cell-cell junctions and adhesions, also suggest a dual role for ROCK

and actomyosin in corneal endothelial barrier disruption and reformation. On the other hand, the protease thrombin and histamine induce massive RhoA-dependent actomyosin contraction and loss of barrier function in corneal endothelial cells, suggesting that Rho-ROCK mediates acute contraction in corneal endothelium in a comparable way to what occurs in other cell monolayers, such as those of vascular endothelial cells.^{25,34,41} Here, we have analyzed the responses of corneal endothelial cells to hyperosmotic stress in vitro and in murine corneas and found that barrier disruption is not prevented by

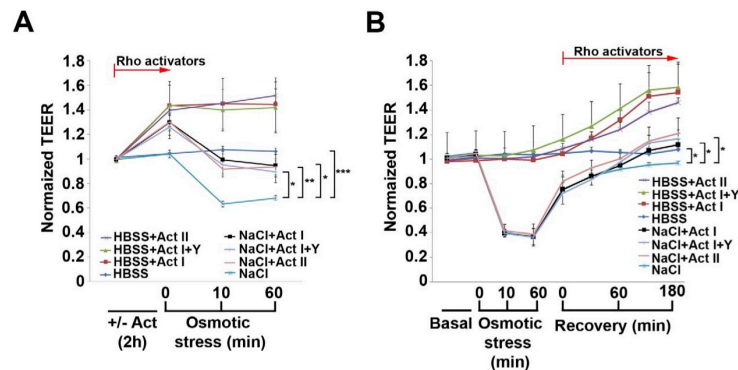


FIGURE 7. RhoA and Rac1 activation preserve endothelial barrier function. Human corneal endothelial cells were grown to confluence in ECIS arrays containing gold electrodes and TEER was analyzed by ECIS. (A) Effect of pretreatment with 1 μ g/ml Act-I (RhoA and Rac1), Act-I + 5 μ M Y-27632 (Rac1), and 5 μ g/ml Act-II (RhoA) on barrier integrity. Contraction upon osmotic stress was induced with an excess of 50 mM NaCl. (B) Effect of treatment with Act I (RhoA and Rac1 activation), Act-I + Y27632 (Rac1 activation), and Act-II (RhoA activation) during the return to iso-osmolality (recovery). To better analyze recovery upon stress withdrawal, cells were exposed to osmotic stress with an excess of 150-mM NaCl, which induced greater barrier disruption. TEER was normalized with respect to resistance values before the beginning of the assay. Absolute TEER values are shown in Supplementary Figure 5. Graphs represent the mean \pm SEM of at least three different experiments. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

inhibition of the RhoA and Rac1 pathways and that, conversely, Rho-ROCK-MLC and Rac1 activities are required to maintain the endothelial barriers. Our results indicate that this does not occur exclusively in the context of hyperosmotic stress, because MLC inhibition (not shown) and RhoA and Rac1 activation constitutively reduce and enhance, respectively, barrier function. Our pull-down assays suggested that the activation of signaling pathways in response to stress could mediate barrier disruption or, conversely, could constitute a cell response to recover homeostatic barrier function. Our results obtained using inhibitors and activators of these pathways suggest that RhoA and Rac1 activation in response to stress induce signaling pathways to homeostatically maintain corneal endothelial barrier function. Hence, we propose that RhoA-ROCK and Rac1 activation could be strategies for preserving endothelial barrier integrity in response to various types of stress, such as inflammatory, mechanical, and osmotic stress.

It is of note that in order to promote cell barrier remodeling through cell migration during, for example, corneal wound healing, it is necessary to reduce the stability of cell-cell junctions.⁴² In general, the dissolution of cell-cell junctions is associated with increased cell adhesion, migration, proliferation, and cancer.^{43,44} Y27632 is currently being used to promote endothelial cell adhesion and migration for wound closure and to promote cell engraftment during endothelial keratoplasty. Given that ROCK inhibition can have a negative effect on cell migration,⁴⁵ the positive effect of ROCK inhibitors in corneal endothelial cells during wound closure^{46,47} could be at least partially related to the function of RhoA-ROCK in cell-cell junction formation. Impairment of cell-cell contacts may have a positive effect on the capacity of individual endothelial cells to adhere to the substratum through focal adhesions, as previously shown in vascular endothelial cells.⁴⁴

Corneal endothelial cells are indeed very sensitive to cell-cell contact inhibition that cause mitotic block. Cell-cell junctions have been perturbed with trypsin EDTA for short periods to unlock this mitotic block and try to promote corneal endothelial cell proliferation in the presence of growth factors. However, this treatment causes epithelial-mesenchymal transition and endothelial cells acquire a fibroblastic phenotype as a consequence.⁴⁸ An alternative and elegant strategy to expand corneal endothelial cell cultures consisted of knocking down p120 catenin, a protein from cell-cell junctions, which induced the activation of the RhoA-ROCK-BMP pathway,

thereby reprogramming HCEC to act as neural crest-like progenitors. This treatment allowed expansion of HCEC progenitors until p120-catenin levels were recovered, the RhoA-ROCK signaling ceased and HCECs reverted to their original endothelial phenotype.^{48,49} Here, we show that hyperosmotic stress recapitulates some of the main requirements for HCEC expansion: reversible cell-cell junction disruption and RhoA-ROCK activation. In addition, active RhoA and Rac1 participate in noncanonical Wnt signaling, which is involved in actin remodeling, development, and epithelial-mesenchymal transition.^{49,50} Thus, it seems plausible to hypothesize that hyperosmotic stress may have an effect on corneal endothelial cell proliferation and differentiation.

The paracellular permeability regulated by cell-cell junctions is essential in the "pump-leak" model proposed to explain the control of stromal hydration by the corneal endothelium.⁵¹ The hydrophilic nature of stromal glycosaminoglycans as well as the IOP from the aqueous humor induce a paracellular passage of liquid toward the stroma that is counter balanced by the protein machinery of transporters at the plasma membrane of endothelial cells, which returns ions and water to the aqueous humor.^{51,52} When leakiness is excessive, the pumping mechanisms are not sufficient to prevent corneal swelling and corneal transparency is reduced. Mutations in some of these endothelial transporters, such as SLC4A11, cause corneal osmotic imbalance, congenital hereditary endothelial dystrophy and Fuchs endothelial corneal dystrophy.^{8,53,54} It is of note that the corneas from the *slc4a11* knockout mice increase NaCl concentration in the stroma, leading to the formation of salt crystals.⁸ This may be an extreme example of osmotic imbalance, but illustrates the fact that dysfunction of the pump-leak equilibrium in corneal pathologies may lead to osmotic stress, which, according to our results, could induce negative feedback by causing additional disruption of the endothelial barrier. Small hypertonic perturbations caused by excess NaCl are compensated by transendothelial fluid transport.^{55,56} We show that crossing a certain threshold of hyperosmolality has a clear effect on tight junctions and paracellular barrier function. Barrier dysfunction upon hyperosmotic shock may occur not only in corneal dystrophies, but also in the manipulation of corneas during keratoplasty procedures, in which the endothelial cells and the anterior chamber are subjected to acute osmotic and mechanical shock. In conclusion, our results demonstrate the

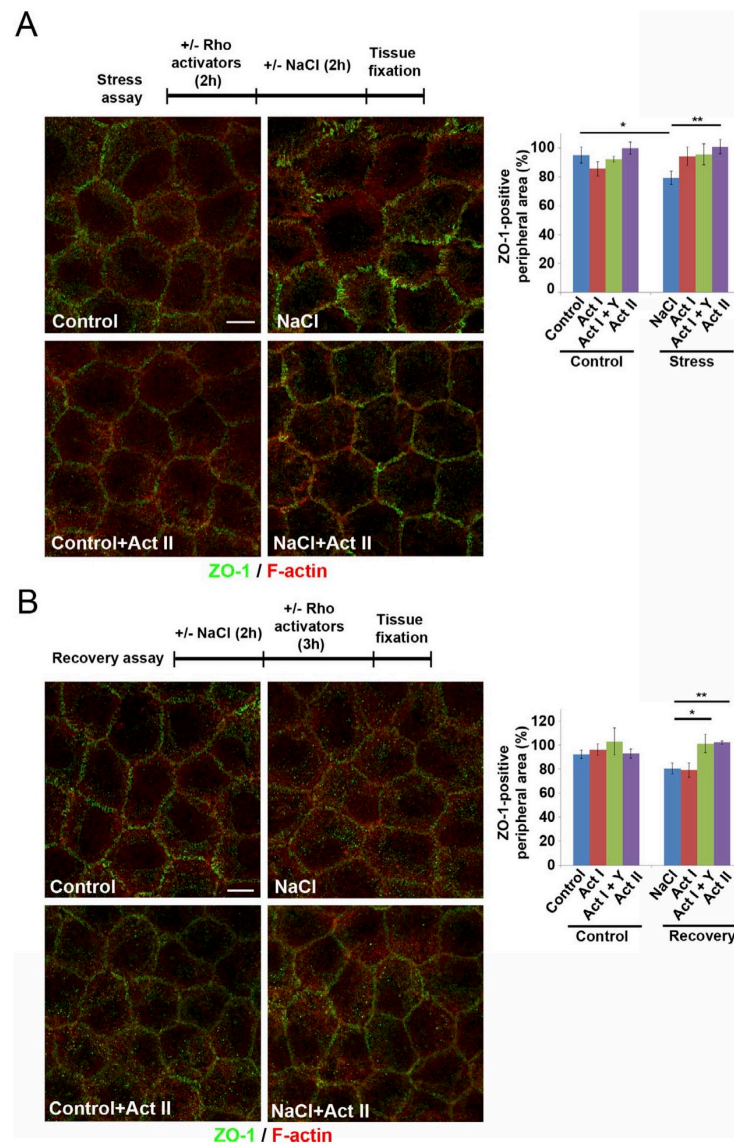


FIGURE 8. RhoA and Rac1 activation preserve barrier function in murine corneas. Murine corneas were dissected out and subjected to the indicated treatments. (A) Representative images of ZO-1 and F-actin staining in corneal endothelium subjected to the indicated treatments in a hyperosmotic stress assay (225-mM excess NaCl). (B) Quantification of the junctional area occupied by ZO-1 in corneal endothelia subjected to iso-osmotic (Control) or hyperosmotic (NaCl) treatments in the presence or absence of Act I (RhoA and Rac1 activation), Act I + Y27632 (Rac1 activation), and Act II (RhoA activation). (C) Representative images of ZO-1 and F-actin staining in corneal endothelium first subjected to iso-osmotic (Control) or hyperosmotic treatments, and then incubated with iso-osmotic Tissue C to promote barrier recovery (NaCl). (D) Quantification of the junctional area occupied by ZO-1 in corneal endothelia after the barrier recovery assay in the presence or absence of Act I (RhoA and Rac1 activation), Act I + Y27632 (Rac1 activation), and Act II (RhoA activation). Scale bar represents 15 μ m. Graphs represents the mean + SEM of at least three different experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

activation of RhoA and Rac1 in response to a stress stimulus that disrupts the endothelial cell-cell junctions. This activation has a positive effect on corneal endothelial barrier function and places these two Rho GTPases at the center of pharmacological strategies for preserving the integrity of the corneal endothelium.

Acknowledgments

The authors thank the expert technical advice of the personnel of the Optical and Confocal Microscopy Facility, the Genomic Facility,

and the Animal Facility of the CBMSO, Madrid. José María Nuñez, the patient who inspired this work, is also acknowledged.

Work supported by ENDOCORNEA (City, State, Country), convenio colaboración CSIC - Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (City, State, Country), and SAF2014-57950-R from MINECO (City, State, Country). The authors declare that no conflicts of interest exist.

Disclosure: M.C. Ortega, None; D. Santander-García, None; B. Marcos-Ramiro, None; S. Barroso, None; S. Cox, None; I. Jiménez-Alfaro, None; J. Millán, None.

References

- Armitage WJ, Moss SJ, Easty DL. Effects of osmotic stress on rabbit corneal endothelium. *Cryobiology*. 1988;25:425-439.
- Armitage WJ, Dick AD, Bourne WM. Predicting endothelial cell loss and long-term corneal graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:3326-3331.
- Srinivas SP. Cell signaling in regulation of the barrier integrity of the corneal endothelium. *Exp Eye Res*. 2012;95:8-15.
- Edelhauser HE. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:1754-1767.
- George AJ, Larkin DF. Corneal transplantation: the forgotten graft. *Am J Transplant*. 2004;4:678-685.
- Niedererkorn JY. Immune mechanisms of corneal allograft rejection. *Curr Eye Res*. 2007;32:1005-1016.
- Fischbarg J, Diecke FP, Iserovich P, Rubashkin A. The role of the tight junction in paracellular fluid transport across corneal endothelium. Electro-osmosis as a driving force. *J Membr Biol*. 2006;210:117-130.
- Groger N, Frohlich H, Maier H, et al. SLC4A11 prevents osmotic imbalance leading to corneal endothelial dystrophy, deafness, and polyuria. *J Biol Chem*. 2010;285:14467-14474.
- Espana EM, Sun M, Birk DE. Existence of corneal endothelial slow-cycling cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:3827-3837.
- Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2012;95:16-23.
- Steed E, Balda MS, Matter K. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol*. 2010;20:142-149.
- Komarova YA, Mehta D, Malik AB. Dual regulation of endothelial junctional permeability. *Sci STKE*. 2007;2007:re8.
- van Nieuw Amerongen GP, Beckers CM, Achehar ID, Zeeman S, Musters RJ, van Hinsbergh VW. Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2332-2339.
- Kimura K, Ito M, Amano M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996;273:245-248.
- Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:446-456.
- Cain RJ, Vanhaesebroeck B, Ridley AJ. The PI3K p110alpha isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. *J Cell Biol*. 2010;188:863-876.
- Samarin S, Nusrat A. Regulation of epithelial apical junctional complex by Rho family GTPases. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:1129-1142.
- Kouklis P, Konstantoulaki M, Vogel S, Broman M, Malik AB. Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ Res*. 2004;94:159-166.
- Marcos-Ramiro B, Garcia-Weber D, Millan J. TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. *Thromb Haemost*. 2014;112.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003;302:1704-1709.
- Quiros M, Nusrat A. RhoGTPases actomyosin signaling and regulation of the epithelial apical junctional complex. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;36:194-203.
- Citi S, Guerrero D, Spadaro D, Shah J. Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome. *Small GTPases*. 2014;5:1-15.
- Satpathy M, Gallagher P, Lizotte-Waniewski M, Srinivas SP. Thrombin-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II in cultured bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2004;79:477-486.
- Satpathy M, Gallagher P, Jin Y, Srinivas SP. Extracellular ATP opposes thrombin-induced myosin light chain phosphorylation and loss of barrier integrity in corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2005;81:183-192.
- Srinivas SP, Satpathy M, Guo Y, Anandan V. Histamine-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II disrupts the barrier integrity of corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:4011-4018.
- Valtink M, Gruschwitz R, Funk RH, Engelmann K. Two clonal cell lines of immortalized human corneal endothelial cells show either differentiated or precursor cell characteristics. *Cells Tissues Organs*. 2008;187:286-294.
- Marcos-Ramiro B, Oliva Nacarino P, Serrano-Pertierra E, et al. Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function. *BMC Neurosci*. 2014;15:110.
- Marcos-Ramiro B, Garcia-Weber D, Barroso S, et al. RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J Cell Biol*. 2016;213:385-402.
- Ren XD, Schwartz MA. Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol*. 2000;325:264-272.
- Mitchell DC, Bryan BA, Liu JP, et al. Developmental expression of three small GTPases in the mouse eye. *Mol Vis*. 2007;13:1144-1153.
- Aktories K, Barbieri JT. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3:397-410.
- Aktories K, Hall A. Botulinum ADP-ribosyltransferase C3: a new tool to study low molecular weight GTP-binding proteins. *Trends Pharmacol Sci*. 1989;10:415-418.
- Montalvo-Ortiz BL, Castillo-Pichardo L, Hernandez E, et al. Characterization of EHOP-016 novel small molecule inhibitor of Rac GTPase. *J Biol Chem*. 2012;287:13228-13238.
- Fernandez-Martin L, Marcos-Ramiro B, Bigarella CL, et al. Crosstalk between reticular adherens junctions and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial barrier function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:e90-e102.
- McKenzie JA, Ridley AJ. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-alpha-induced changes in endothelial morphology and permeability. *J Cell Physiol*. 2007;213:221-228.
- Wojciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ. Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1998;176:150-165.
- Schmidt G, Schr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature*. 1997;387:725-729.
- Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1123:134-145.
- Beckers CM, van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP. Driving Rho GTPase activity in endothelial cells regulates barrier integrity. *Thromb Haemost*. 2010;103:40-55.
- Schlegel N, Meir M, Spindler V, Germer CT, Waschke J. Differential role of Rho GTPases in intestinal epithelial barrier regulation in vitro. *J Cell Physiol*. 2011;226:1196-1203.
- Shivanna M, Jalimarada SS, Srinivas SP. Lovastatin inhibits the thrombin-induced loss of barrier integrity in bovine corneal endothelium. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2010;26:1-10.
- Savagner P. Epithelial-mesenchymal transitions: from cell plasticity to concept elasticity. *Curr Top Dev Biol*. 2015;112:273-300.
- Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell*. 2003;4:499-515.

Homeostatic RhoA and Rac1 Activation Upon Stress

IOVS | Month 2016 | Vol. 57 | No. 0 | 13

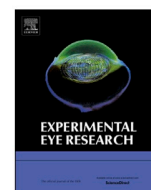
44. Millan J, Cain RJ, Reglero-Real N, et al. Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol.* 2010;8:11.
45. Sanz-Moreno V, Gaggioli C, Yeo M, et al. ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell.* 2011;20:229–245.
46. Pipparelli A, Arsenijevic Y, Thuret G, Gain P, Nicolas M, Majo F. ROCK inhibitor enhances adhesion and wound healing of human corneal endothelial cells. *PLoS One* 2013;8:e62095.
47. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, et al. Enhancement of corneal endothelium wound healing by Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor eye drops. *Br J Ophthalmol.* 2011;95:1006–1009.
48. Zhu YT, Chen HC, Chen SY, Tseng SC. Nuclear p120 catenin unlocks mitotic block of contact-inhibited human corneal endothelial monolayers without disrupting adherent junctions. *J Cell Sci.* 2012;125:3636–3648.
49. Zhu YT, Li F, Han B, et al. Activation of RhoA-ROCK-BMP signaling reprograms adult human corneal endothelial cells. *J Cell Biol.* 2014;206:799–811.
50. Wynshaw-Boris A. Dishevelled: in vivo roles of a multifunctional gene family during development. *Curr Top Dev Biol.* 2012;101:213–235.
51. Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res.* 2012;95:2–7.
52. Srinivas SP. Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium. *Optom Vis Sci.* 2010;87:E239–E254.
53. Vithana EN, Morgan PE, Ramprasad V, et al. SLC4A11 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2008;17:656–666.
54. Vithana EN, Morgan P, Sundaresan P, et al. Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2). *Nat Genet.* 2006;38:755–757.
55. Sanchez JM, Li Y, Rubashkin A, et al. Evidence for a central role for electro-osmosis in fluid transport by corneal endothelium. *J Membr Biol.* 2002;187:37–50.
56. Ruberti JW, Klyce SD. NaCl osmotic perturbation can modulate hydration control in rabbit cornea. *Exp Eye Res.* 2003;76:349–359.





Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Eye Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexer

A human cellular system for analyzing signaling during corneal endothelial barrier dysfunction



Diana Santander-García ^{a, b, c, d, 1}, María Cristina Ortega ^{a, 1}, Silvia Benito-Martínez ^a,
Susana Barroso ^a, Ignacio Jiménez-Alfaro ^{c, d}, Jaime Millán ^{a, *}

^a Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid, Spain

^b Department of Ophthalmology, Hospital Universitario Rey Juan Carlos, Mostoles, Spain

^c Department of Ophthalmology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^d Instituto de Investigación Sanitaria, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 May 2016

Received in revised form

25 August 2016

Accepted in revised form 30 September 2016

Available online 30 September 2016

Keywords:

Corneal endothelium

Barrier function

Actomyosin

Rho GTPase

RhoA

Rho kinase

Thrombin

ABSTRACT

Correct corneal endothelial barrier function is essential for maintaining corneal transparency. However, research on cell signaling pathways mediating corneal endothelial barrier dysfunction has progressed more slowly than that involving other cellular barriers because of the lack of human corneal endothelial cell models. Here we have optimized the culture of the human corneal endothelial cell (HCEC) line B4G12 as a model for studying paracellular permeability. We show that B4G12-HCECs form confluent monolayers with stable cell-cell junctions when cultured on plastic, but not glass, surfaces precoated with various extracellular matrix components. Cell morphometry and measuring intercellular spaces and transendothelial electric resistance indicate that B4G12-HCECs form optimal monolayers on collagen and fibronectin. Based on the use of specific inhibitors, it has been proposed that the Rho-regulated kinases, ROCK-I and ROCK-II, mediate actomyosin-induced contraction in corneal endothelial cell barriers. ROCKs are effectors of RhoA, RhoB and RhoC. We show that the GTPase RhoA and its effector ROCK-II are predominantly expressed in B4G12-HCECs and primary human corneal endothelial cells. The activation of Rho GTPases during acute barrier disruption has not been investigated in corneal endothelial cells. RhoA, but not other related GTPases that are highly expressed in B4G12-HCECs, such as Rac1 and Cdc42, is transiently activated during barrier disruption in response to the inflammatory mediator thrombin. Pharmacological inhibition of RhoA and ROCK reduces B4G12-HCEC acute contraction. We propose that exploiting B4G12-HCECs is a useful experimental strategy for gaining further insight into the signaling pathways involved in human corneal endothelial barrier function.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The corneal endothelium maintains the stromal deturgescence and transparency of the cornea. The corneal endothelial monolayer coordinates the paracellular passage of water between endothelial cell-cell junctions, induced by the pressure in the aqueous humor (Fischbarg et al., 2006; Srinivas, 2012), with a counterbalancing

pumping system for water and ions, composed of endothelial protein transporters that maintain stromal dehydration and prevent swelling (George and Larkin, 2004; Groger et al., 2010). Corneal endothelial barrier dysfunction occurs in pathological conditions such as Fuchs' dystrophy (Schmidt et al., 2012; Vithana et al., 2008) and during ophthalmic procedures, such as cataract surgery (Rosado-Adames and Afshari, 2012), which eventually induces swelling and the need for keratoplasty (Edelhauser, 2006; George and Larkin, 2004; Srinivas, 2012). Approximately, 40% of all corneal keratoplasties are caused by corneal endothelial barrier dysfunction (Eye Bank Association of America, 2013), which is leading to the substitution of full corneal transplantation by endothelial keratoplasty or Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty as the main treatment (Ang et al., 2016; Okumura et al., 2014). Despite the importance of corneal

Abbreviations: HCEC, human corneal endothelial cell; GTPase, guanosine triphosphatase; GTP, guanosine triphosphate; ROCK, Rho kinase; MRCK, myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase; ECIS, electric cell substrate impedance sensing; TEER, transendothelial electric resistance; MLC, myosin light chain; TRITC, tetramethylrhodamine; ZO-1, zonula occludens-1; RBD, Rho-binding domain; GST, glutathione S-transferase.

* Corresponding author. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM-CSIC, C/ Nicolás Cabrera 1, Cantoblanco, 28770, Madrid, Spain.

E-mail address: jmillan@cbm.csic.es (J. Millán).

¹ Equal contribution.

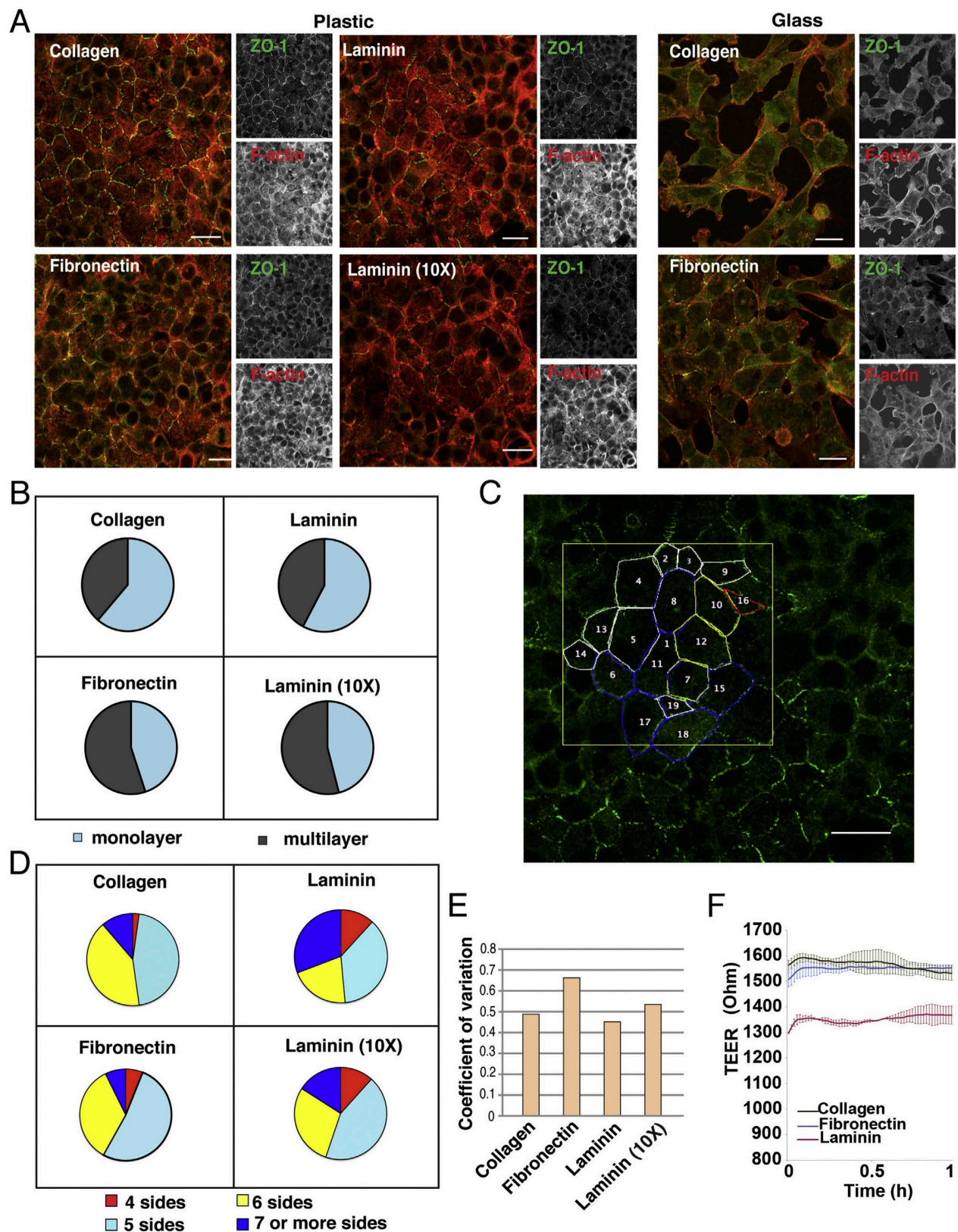


Fig. 1. In vitro formation of confluent monolayers of B4G12-HCECs resembling the human corneal endothelium. (A) Representative confocal images of B4G12-HCECs seeded on plastic or glass surfaces precoated with the indicated ECM for at least 3 h at 37 °C. ZO-1 staining shows the distribution of cell-cell tight junctions. The cytoskeleton of filamentous (F)-actin was detected with phalloidin-TRITC. (B) Quantification of the area covered B4G12-HCECs forming monolayers vs. multilayers when grown on plastic coverslips precoated with the indicated ECM components. (C) Representative example of the quantification of the number of sides of each cell in confluent monolayers of B4G12-HCECs seeded on plastic coverslips precoated with the indicated ECM components. (D) Quantification of (C). (E) Coefficient of variation of B4G12-HCECs monolayers calculated as the standard deviation of quantified cellular areas divided by its mean. (F) ECIS analysis of TEER of B4G12-HCEC monolayers seeded on ECIS arrays (Ibidi) precoated with the ECM components. Note that resistance, that is, barrier integrity, is lower in cells grown on 10 ng/ml laminin. Scale bars, 20 μ m.

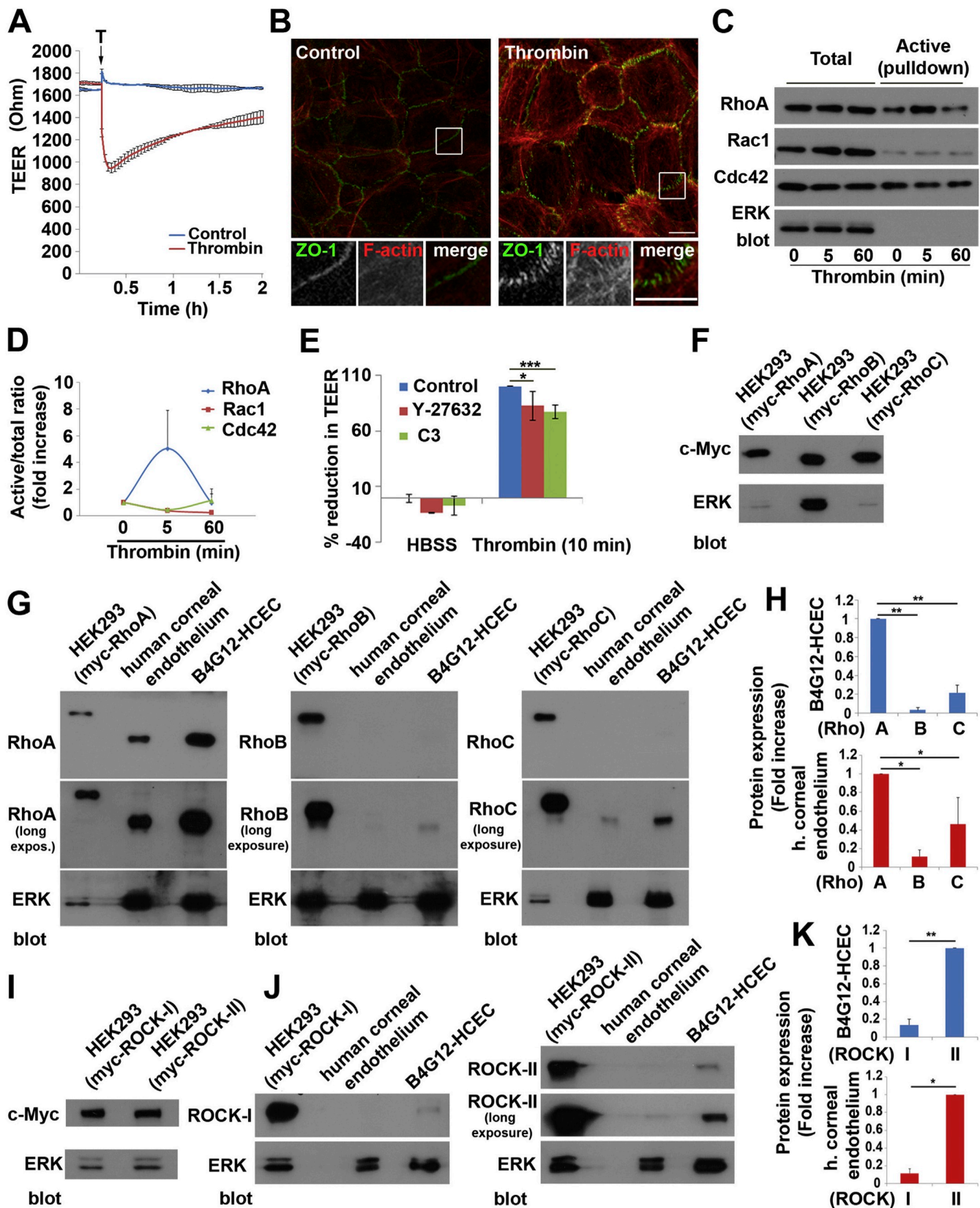


Fig. 2. B4G12-HCEC barriers as a tool to investigate intracellular signaling during corneal endothelial barrier disruption. (A) Thrombin induces acute endothelial barrier disruption in B4G12-HCEC monolayers. B4G12-HCECs were grown at confluence on ECIS arrays (Ibidi) precoated with collagen for a minimum of three days. Cells were stimulated (red line) or not (blue line) with 1 U/ml of thrombin. Thrombin transiently disrupted the endothelial barrier as indicated by the TEER decrease. (B) Thrombin induces an increase in F-actin staining and the remodeling of cell-cell tight junctions. B4G12-HCECs were grown at confluence for three days on microscopy-grade plastic dishes precoated with collagen,

endothelial cells, the research output on corneal endothelial barrier function is very limited compared with that on other human cell types that form cellular barriers. Here we have optimized the experimental conditions to facilitate the use of B4G12-HCECs for morphological and biochemical studies of endothelial barrier function.

The human corneal endothelial cell line B4G12 was established by Valtink and colleagues in 2008 from human corneal endothelial cells immortalized by transfection of a plasmid containing the T antigen of SV40. These cells were subsequently subcloned and the B4G12-HCEC clone was selected on the basis of morphological and protein expression criteria (Bednarsz et al., 2000; Valtink et al., 2008). These cells grew to confluence on plastic, forming monolayers of cells with cobblestone morphology, expressing corneal endothelial markers such as 9.3.E-antigen, ZO-1 and occludin, and depositing extracellular collagen in a comparable way to that observed in healthy primary HCECs (Valtink et al., 2008). Since then, B4G12-HCECs have been used as a model for testing new therapies to promote HCEC survival (Valtink et al., 2012) and proliferation (Hsueh et al., 2015), and to study inflammatory signaling (Lee and Heur, 2014). We obtained immortalized human B4G12-HCECs as a generous donation from Dr. Valtink (Faculty of Medicine Carl Gustav Carus, TU Dresden, Germany) and cultured them as described (Valtink et al., 2008). Briefly, B4G12-HCECs were grown in human endothelial serum-free medium (Gibco Invitrogen) supplemented with 10 ng/ml human FGF2 (Sigma-Aldrich) without antibiotics, in 5% CO₂ atmosphere in a cell incubator at 37 °C. Cells were grown to confluence on plastic dishes precoated with a solution of extracellular matrix components: 1 mg/ml chondroitin sulfate and 10 µg/ml of laminin (Sigma-Aldrich). Cells are usually cultured on microscopy-grade glass coverslips to perform high resolution confocal microscopy studies *in vitro*, since glass has better optical properties than other transparent culture surfaces (Brelje et al., 2002). We followed standard procedures (Marcos-Ramiro et al., 2016) and covered glass microscope coverslips with the same solution overnight at 37 °C, and then plated the cells at more than 10×10^5 cells per 12 mm-diameter coverslip (Thermo Scientific). This quantity of cells guarantees cell confluence over this surface area with no requirement for further cell proliferation once cells have attached to the coverslip. Surprisingly, cells were unable to form cell-cell contacts or a confluent monolayer even more than three days after the initial seeding, suggesting that B4G12-HCECs cannot properly adhere on glass coverslips (not shown). We then analyzed the formation of confluent B4G12-HCEC monolayers on dishes containing a plastic bottom made of a proprietary hydrophilic polymer surface (Ibidi), which is suitable for high-resolution confocal microscopy. We coated these dishes with several extracellular matrix components routinely used to promote

adhesion of various cell types to solid substrates. We compared cell morphometry and confluence by staining for the tight junction marker zonula occludens (ZO)-1 with a specific rabbit antibody (Sigma-Aldrich), and for the filamentous (F)-actin with phalloidin conjugated to the fluorophore tetramethylrhodamine (TRITC) (Sigma-Aldrich) (Gruschwitz et al., 2010; Millan et al., 2010; Reglero-Real et al., 2014). Confocal images were analyzed with Fiji software (University Wisconsin-Madison) to quantify cell morphology. The microscopy-grade plastic dishes were coated overnight with 10 µg/ml laminin, the concentration recommended for HCEC culture and for experiments of cell adhesion in various cell types (Edgar et al., 1984; Nishiuchi et al., 2006), laminin ten times more concentrated than recommended (100 µg/ml), 150 µg/ml rat collagen solution (Corning Inc.) and 10 µg/ml fibronectin (Sigma-Aldrich) (Fig. 1A, left images). Then, B4G12-HCECs were seeded at confluence and cultured for 72 h. Cells established proper cell-cell junctions, and covered more than 97% of the plastic surface, as shown by the junctional distribution of ZO-1 and F-actin. Junctional ZO-1 staining was slightly more intense in cells grown on collagen and fibronectin than in cells on laminin-coated dishes. In contrast, cells onto fibronectin-coated and collagen-coated glass coverslips did not reach confluence after a 72 h culture period (Fig. 1A, right images), similar to what was previously observed with laminin-coated glass coverslips.

Next, we investigated in greater detail the properties of B4G12-HCEC monolayers cultured on each extracellular matrix component. Upon confluence, B4G12-HCECs do not stop growing, but form multilayered clusters due to defective mechanisms of growth inhibition by intercellular contacts (Valtink et al., 2008). Confocal imaging at different sections in the z-axis revealed that cells cultured on collagen-coated plastic dishes covered a higher proportion of the dish with a cell monolayer instead of a multilayer, suggesting that the collagen favors better contact inhibition (Fig. 1B). Morphometric analysis of HCECs provides information on the integrity of the corneal endothelial barrier and about cell loss. Polygonal shape and the coefficient of variation of cell area were measured in cells grown on the different coatings. The shape of cells on laminin was more heterogeneous than that of cells on fibronectin and collagen, which were mostly pentagonal and hexagonal in shape (Fig. 1C,D). The coefficient of variation was higher for cells on fibronectin, whereas cell monolayers on collagen and laminin were more homogeneous in size (Fig. 1E). Nevertheless, these coefficients were far greater than those observed for primary endothelial cells in human corneas, suggesting that this cellular system has its limitations and that the data obtained from it should be validated in a more physiological system. Transendothelial electric resistance (TEER) directly correlates with barrier integrity (Tiruppathi et al., 1992). We subjected these cells to TEER

stimulated or not with 1 U/ml of thrombin, fixed and stained for F-actin and ZO-1. Scale bars, 10 µm (C) Thrombin activates RhoA but not Rac1 and Cdc42. B4G12-HCECs were grown at confluence for a minimum of three days, stimulated with 1 U/ml of thrombin at the indicated times, lysed and subjected to pulldown assays to detect active RhoA, Rac1 and Cdc42. (D) Quantification of Rho GTPase activation by calculating the ratio between the amount of each Rho protein detected by western blot in the pulldown fraction (active) and the Rho protein detected in the cell lysates (total). Mean ± S.E.M. of three different experiments. Western blot with anti-ERK (Santa Cruz) shows the loading control. (E) Quantification of the percentage of the maximum reduction in TEER (acute contraction) obtained in untreated cells, in cells treated with 5 µM Y-27632 to inhibit ROCK-I and ROCK-II and in cells treated with 0.5 µg/ml C3 transferase to inhibit RhoA, RhoB and RhoC, stimulated or not with 1 U/ml of thrombin for 10 min (F) Three different lysates of HEK293 cells expressing similar levels of exogenous RhoA, RhoB and RhoC tagged with the same c-myc epitope were generated as internal standards by performing western blot with anti-myc antibody (Merck-Millipore). (G) Relative expression levels of RhoA, RhoB and RhoC in primary human corneal endothelial cells and in B4G12-HCECs. The HEK293 cell lysate containing the corresponding exogenous myc-Rho was blotted next to the lysate of a Descemet membrane not suitable for transplant containing corneal endothelial cells and the lysate of B4G12-HCECs with antibodies against RhoA (Santa Cruz), RhoB (Santa Cruz) and RhoC (Cell Signaling). (H) Quantification of the expression levels of RhoA, RhoB and RhoC relative to that of RhoA in three different experiments which shows that RhoA is the major Rho GTPase expressed in B4G12-HCECs and human corneal endothelial cells. (I) Two different lysates of HEK293 cells expressing similar levels of exogenous ROCK-I and ROCK-II tagged with the c-myc epitope were generated as internal standards. (J) Relative expression levels of ROCK-I and ROCK-II primary human corneal endothelial cells and B4G12-HCECs. The HEK293 cell lysate containing the corresponding exogenous myc-ROCK was blotted next to the lysate of a Descemet membrane not suitable for transplant containing corneal endothelial cells, and the lysate of B4G12-HCECs with antibodies against ROCK-I and ROCK-II (BD biosciences) (K) Quantification of the expression levels of ROCK-I and ROCK-II relative to that of ROCK-II in three different experiments shows that ROCK-II is the major Rho kinase expressed in B4G12-HCECs and human corneal endothelial cells. *, p-value<0.05; **, p-value<0.01. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

measurements with an electric cell substrate impedance system (ECIS) (Applied Biophysics) (Marcos-Ramiro et al., 2016; Tiruppathi et al., 1992) and found that, in accordance with the morphological observations, confluent B4G12-HCECs seeded on collagen- and fibronectin-coated ECIS wells yielded higher TEER values than cells plated on laminin-coated wells. This indicates that collagen and fibronectin enhance barrier function compared with laminin (Fig. 1F). In summary, these analyses suggest that the optimal conditions for forming a confluent monolayer for B4G12-HCEC are seeding them on plastic surfaces coated with collagen or fibronectin, but not with laminin.

The Rho family of GTPases regulates a plethora of effectors and comprises the master regulators of the cell cytoskeleton and barrier function (Heasman and Ridley, 2008; Ridley, 2001). RhoA, Rac and Cdc42 are the main Rho GTPases controlling the actomyosin cytoskeleton through the phosphorylation of the myosin light chain (MLC), which activates non-muscle myosin II and induces actomyosin-mediated contraction (Komarova et al., 2007; Srinivas, 2012; Wilkinson et al., 2005; Zhao and Manser, 2015). Based on the use of pharmacological inhibitors, it has been suggested that the Rho-kinase (ROCK)-mediated signaling is essential for corneal endothelial barrier function, endothelial migration and corneal wound healing (Olson, 2008; Srinivas, 2012; Srinivas et al., 2006). ROCK is a downstream effector of the RhoA subfamily of GTPases and its inhibition prevents the increase of MLC phosphorylation during barrier disruption in corneal endothelial cells (Satpathy et al., 2004). However, other GTPases, such as Cdc42 and Rac1, could also control MLC phosphorylation and myosin II activation in a parallel signaling pathway mediated by the myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases (MRCKs) (Wilkinson et al., 2005; Zhao and Manser, 2015). To detect Rho GTPase activity biochemically, cell lysates are subjected to pulldown assays, in which they are incubated with recombinant proteins containing active Rho-binding domains (RBDs) from specific effectors, which are conjugated to solid substrates that enable GTP-loaded, active Rho proteins to be isolated from the lysate (Ren and Schwartz, 2000). Pulldown assays usually require hundreds of thousands of cells, which, in the case of corneal endothelial cells, are difficult to obtain. This is probably the reason why an analysis of the activation of Rho GTPases during actomyosin-mediated barrier disruption has not been reported in human corneal endothelial cells so far. Corneal endothelial cell monolayer disruption has been studied using inflammatory mediators that induce acute contraction, such as thrombin and histamine (Satpathy et al., 2004; Srinivas et al., 2006). We addressed the utility of B4G12 cells to gain insight into signaling mediating actomyosin-mediated corneal endothelial barrier disruption. Thrombin (Sigma-Aldrich) induced acute contraction in B4G12-HCECs seeded on collagen-coated surfaces (Fig. 2A), similar to that detected in primary bovine corneal endothelial cells and vascular endothelial cells (Fernandez-Martin et al., 2012; Marcos-Ramiro et al., 2016; Shivanna et al., 2010). This acute contraction correlated with a reorientation of the tight junction component ZO-1 perpendicular to cell-cell borders and with an increase in F-actin (Fig. 2B). To establish whether RhoA, Rac1 and Cdc42 are activated during acute contraction, pulldown assays were performed during a time course of thrombin stimulation using between 2 to 4×10^6 cells per condition (Fig. 2C). Active RhoA was detected by pulldown assay with recombinant glutathione S-transferase (GST) conjugated to the RBD of the Rho effector rho-kinase (Ren and Schwartz, 2000). Active Rac and Cdc42 were detected by pulldown assay of GST-conjugated to the Rac and Cdc42-binding domain of the effector PAK1 (Marcos-Ramiro et al., 2016). Thrombin induced an early and transient activation of RhoA, previous to the acute contraction phase. Parallel to RhoA activation, Rac1 activity slightly decreased and no changes in Cdc42 were

detected, suggesting that Rac1 and Cdc42 have a minor role in corneal endothelial barrier disruption (Fig. 2C, D). In accordance with these results, thrombin-induced acute contraction was reduced in the presence of the RhoA inhibitor C3-transferase (Cytoskeleton) and the inhibitor of the downstream RhoA subfamily effector ROCK, Y-27632 (Calbiochem) (Fig. 2E).

Finally, RhoA belongs to a subfamily of Rho GTPases formed by RhoA, RhoB and RhoC, which have a high degree of sequence identity. They share the common effector ROCK but also play specific roles (Marcos-Ramiro et al., 2016; Wheeler and Ridley, 2004). In addition, there are two ROCK proteins, ROCK-I and ROCK-II, involved in actomyosin-mediated contraction (Kumper et al., 2016; Riento and Ridley, 2003). To investigate whether signaling in B4G12-HCECs is comparable to that of primary human corneal endothelial cells, we aimed to quantify the relative amounts of the main components of the RhoA subfamily-ROCK pathway following an experimental strategy previously described for human vascular endothelial cells (Marcos-Ramiro et al., 2016). First, we transfected HEK293 cells with expression plasmids coding for RhoA, RhoB and RhoC proteins, all tagged with the same c-myc epitope (Fig. 2F). By blotting against the c-myc tag in these three lysates, we were able to generate western blot standards expressing equal levels of exogenous RhoA, RhoB and RhoC proteins. Lysates from B4G12-HCECs and primary human corneal endothelial cells were then blotted for endogenous RhoA, RhoB and RhoC with specific antibodies in parallel with the internal standard expressing the corresponding exogenous Rho protein (Fig. 2G). The band intensities from the internal standards were used to normalize the relative levels of endogenous RhoA, RhoB and RhoC in the corneal endothelial cells. Western blot analysis indicated that RhoA was highly expressed in B4G12-HCECs and primary human corneal endothelial cells, whereas RhoB and RhoC expression was comparatively low (Fig. 2G, H). Likewise, lysates of HEK293 expressing exogenous ROCK-I and ROCK-II proteins tagged with the c-myc epitope (Fig. 2I) were used as standards to quantify the relative abundance of ROCK-I and ROCK-II. ROCK-II expression levels were comparatively higher than those of ROCK-I in B4G12-HCECs and in human corneal endothelial cells (Fig. 2J, K). Collectively, these results show that growing B4G12-HCECs at confluence for 72 h on plastic surfaces precoated with collagen or fibronectin is a suitable model for investigating the corneal endothelial cell signaling involved in endothelial barrier function. Our data comparing B4G12-HCECs and primary human corneal endothelium indicate that their relative expression levels of RhoA and ROCK subfamily members are similar, suggesting that this cell line is a good model for investigating signaling during human corneal endothelial barrier dysfunction *in vitro*.

Acknowledgments

The expert technical advice of the Confocal Microscopy Facility and the Genomics facility at the CBMSO, Madrid, is gratefully acknowledged. Prof. Anne J. Ridley (Kings College London) generous donation of plasmids coding for the myc-tagged proteins is also gratefully acknowledged. Work supported by grants Endo-cornea, convenio colaboración CSIC, from Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz and SAF2014-57950-R from MINECO. The authors declare that no conflict of interest exists.

References

- Ang, M., Wilkins, M.R., Mehta, J.S., Tan, D., 2016. Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Br. J. Ophthalmol.* 100, 15–21.
- Bednarsz, J., Teifel, M., Friedl, P., Engelmann, K., 2000. Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta*

- Ophthalmol. Scand. 78, 130–136.
- Brelje, T.C., Wessendorf, M.W., Sorenson, R.L., 2002. Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations. *Methods Cell Biol.* 70, 165–244.
- Edelhauser, H.F., 2006. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1754–1767.
- Edgar, D., Timpl, R., Thoenen, H., 1984. The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J.* 3, 1463–1468.
- Eye Bank Association of America, 2013. Eye Banking Statistical Report.
- Fernandez-Martin, L., Marcos-Ramiro, B., Bigarella, C.L., Graupera, M., Cain, R.J., Reglero-Real, N., Jimenez, A., Cernuda-Morollon, E., Correas, I., Cox, S., Ridley, A.J., Millan, J., 2012. Crosstalk between reticular adherens junctions and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial barrier function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, e90–e102.
- Fischbarg, J., Diecke, F.P., Iserovich, P., Rubashkin, A., 2006. The role of the tight junction in paracellular fluid transport across corneal endothelium. *Electro-osmosis as a driving force. J. Membr. Biol.* 210, 117–130.
- George, A.J., Larkin, D.F., 2004. Corneal transplantation: the forgotten graft. *Am. J. Transpl.* 4, 678–685.
- Groger, N., Frohlich, H., Maier, H., Olbrich, A., Kostin, S., Braun, T., Boettger, T., 2010. SLC4A11 prevents osmotic imbalance leading to corneal endothelial dystrophy, deafness, and polyuria. *J. Biol. Chem.* 285, 14467–14474.
- Gruschwitz, R., Friedrichs, J., Valtink, M., Franz, C.M., Muller, D.J., Funk, R.H., Engelmann, K., 2010. Alignment and cell-matrix interactions of human corneal endothelial cells on nanostructured collagen type I matrices. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 6303–6310.
- Heasman, S.J., Ridley, A.J., 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.
- Hsueh, Y.J., Chen, H.C., Wu, S.E., Wang, T.K., Chen, J.K., Ma, D.H., 2015. Lysophosphatidic acid induces YAP-promoted proliferation of human corneal endothelial cells via PI3K and ROCK pathways. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2, 15014.
- Komarova, Y.A., Mehta, D., Malik, A.B., 2007. Dual regulation of endothelial junctional permeability. *Sci. STKE* 2007, re8.
- Kumper, S., Mardakheh, F.K., McCarthy, A., Yeo, M., Stamp, G.W., Paul, A., Worboys, J., Sadok, A., Jorgensen, C., Guichard, S., Marshall, C.J., 2016. Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis. *Elife* 5.
- Lee, J.G., Heur, M., 2014. Interleukin-1 β -induced Wnt5a enhances human corneal endothelial cell migration through regulation of Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell Biol.* 34, 3535–3545.
- Marcos-Ramiro, B., Garcia-Weber, D., Barroso, S., Feito, J., Ortega, M.C., Cernuda-Morollon, E., Reglero-Real, N., Fernandez-Martin, L., Duran, M.C., Alonso, M.A., Correas, I., Cox, S., Ridley, A.J., Millan, J., 2016. RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J. Cell Biol.* 213, 385–402.
- Millan, J., Cain, R.J., Reglero-Real, N., Bigarella, C., Marcos-Ramiro, B., Fernandez-Martin, L., Correas, I., Ridley, A.J., 2010. Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol.* 8, 11.
- Nishiuchi, R., Takagi, J., Hayashi, M., Ido, H., Yagi, Y., Sanzen, N., Tsuji, T., Yamada, M., Sekiguchi, K., 2006. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant α 3 β 1, α 6 β 1, α 7 β 1 and α 6 β 4 integrins. *Matrix Biol.* 25, 189–197.
- Okumura, N., Kinoshita, S., Koizumi, N., 2014. Cell-based approach for treatment of corneal endothelial dysfunction. *Cornea* 33 (Suppl. 11), S37–S41.
- Olson, M.F., 2008. Applications for ROCK kinase inhibition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 242–248.
- Reglero-Real, N., Alvarez-Varela, A., Cernuda-Morollon, E., Feito, J., Marcos-Ramiro, B., Fernandez-Martin, L., Gomez-Lechon, M.J., Muntane, J., Sandoval, P., Majano, P.L., Correas, I., Alonso, M.A., Millan, J., 2014. Apicobasal polarity controls lymphocyte adhesion to hepatic epithelial cells. *Cell Rep.* 8, 1879–1893.
- Ren, X.D., Schwartz, M.A., 2000. Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol.* 325, 264–272.
- Ridley, A.J., 2001. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11, 471–477.
- Riento, K., Ridley, A.J., 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 446–456.
- Rosado-Adames, N., Afshari, N.A., 2012. The changing fate of the corneal endothelium in cataract surgery. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 23, 3–6.
- Satpathy, M., Gallagher, P., Lizotte-Waniewski, M., Srinivas, S.P., 2004. Thrombin-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II in cultured bovine corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res.* 79, 477–486.
- Schmedt, T., Silva, M.M., Ziaei, A., Jurkunas, U., 2012. Molecular bases of corneal endothelial dystrophies. *Exp. Eye Res.* 95, 24–34.
- Shivanna, M., Jalimarada, S.S., Srinivas, S.P., 2010. Lovastatin inhibits the thrombin-induced loss of barrier integrity in bovine corneal endothelium. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 26, 1–10.
- Srinivas, S.P., 2012. Cell signaling in regulation of the barrier integrity of the corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 95, 8–15.
- Srinivas, S.P., Satpathy, M., Guo, Y., Anandan, V., 2006. Histamine-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II disrupts the barrier integrity of corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4011–4018.
- Tirupathi, C., Malik, A.B., Del Vecchio, P.J., Keese, C.R., Giaever, I., 1992. Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7919–7923.
- Valtink, M., Gruschwitz, R., Funk, R.H., Engelmann, K., 2008. Two clonal cell lines of immortalized human corneal endothelial cells show either differentiated or precursor cell characteristics. *Cells Tissues Organs* 187, 286–294.
- Valtink, M., Knels, L., Stanke, N., Engelmann, K., Funk, R.H., Lindemann, D., 2012. Overexpression of human HMW FGF-2 but not LMW FGF-2 reduces the cytotoxic effect of lentiviral gene transfer in human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 3207–3214.
- Vithana, E.N., Morgan, P.E., Ramprasad, V., Tan, D.T., Yong, V.H., Venkataraman, D., Venkataraman, A., Yam, G.H., Nagasamy, S., Law, R.W., Rajagopal, R., Pang, C.P., Kumaramanickevel, G., Casey, J.R., Aung, T., 2008. SLC4A11 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 17, 656–666.
- Wheeler, A.P., Ridley, A.J., 2004. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.* 301, 43–49.
- Wilkinson, S., Paterson, H.F., Marshall, C.J., 2005. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat. Cell Biol.* 7, 255–261.
- Zhao, Z., Manser, E., 2015. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases (MRCK), the ROCK-like effectors of Cdc42 and Rac1. *Small GTPases* 6, 81–88.

